



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10179169 A**(43) Date of publication of application: **07 . 07 . 98**

(51) Int. Cl.

**C12N 15/09**  
**C12N 5/10**  
**// C12N 9/10**  
**(C12N 15/09 , C12R 1:91 )**

(21) Application number: **09243357**(22) Date of filing: **25 . 08 . 97**(30) Priority: **23 . 08 . 96 JP 08222884**(71) Applicant: **IMMUNO JAPAN:KK**(72) Inventor: **SUZUKI SADAHIKO**  
**NAKAMURA TETSUO****(54) EXPRESSION VECTOR FOR MAMMALIAN CELL****(57) Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide an expression vector capable of making a high level production of a genetic recombinant protein by using a mammalian cell as a host.

**SOLUTION:** This expression vector which uses a promoter having low expression inductivity as a promoter in a plasmid and has a gene cistron of wasting neomycinphosphotransferase such as neomycinphosphotransferase cistron, etc., having an

insertion sequence containing at least one couple of a sequence capable of coding an amino acid sequence between a sequence of the promoter and sector of a gene translation of the neomycintransferase and a multicloning site for gene integration having strong manifestation inducing promoter. This vector induces the high productivity of the genetic recombinant protein the hose mammalian cell. This vector preferably contains a gene cistron of dihydrofolic acid reducing enzyme using low expression inducing promoter as a promoter.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-179169

(43) 公開日 平成10年(1998) 7月7日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

5/10

9/10

// C 1 2 N 9/10

5/00

B

(C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 R 1:91)

審査請求 未請求 請求項の数13 F D (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願平9-243357

(22) 出願日 平成9年(1997) 8月25日

(31) 優先権主張番号 特願平8-222884

(32) 優先日 平8 (1996) 8月23日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 391039391

株式会社イムノ・ジャパン

東京都杉並区荻窪4丁目28番14-701号

(72) 発明者 鈴木 定彦

奈良県大和郡山市小泉町2778-5

(72) 発明者 中村 徹雄

東京都杉並区荻窪4丁目28番14-701号

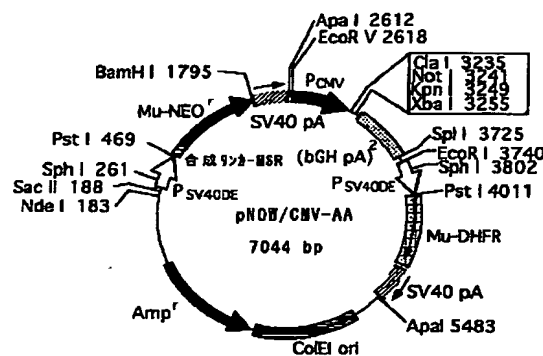
(74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54) 【発明の名称】 哺乳動物細胞用発現ベクター

(57) 【要約】

【課題】 哺乳動物細胞を宿主として高水準の遺伝子組換タンパク質生産を可能にする発現ベクターを提供する。

【解決手段】 プラスミド中に、プロモーターとして発現誘導性の低いプロモーターを使用し、かつ該プロモーターの配列とネオマイシントランスフェラーゼ遺伝子翻訳領域との間にアミノ酸配列をコードし得る配列を少なくとも1組含んでなる挿入配列を有するネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼシストロンなどの消耗性ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子シストロンおよび強発現誘導性プロモーターを有する遺伝子組み込み用マルチクロニングサイトを有し、哺乳動物宿主細胞において遺伝子組み換えタンパク質の高生産性を誘導する発現ベクター。本ベクターは、好ましくはプロモーターとして発現誘導性の低いプロモーターを使用したジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子シストロンも含む。



Amp<sup>r</sup> アンピシリン耐性遺伝子  
(bGH pA)<sup>2</sup> ウシ成長ホルモンポリアデニレーションシグナル  
ColEI ori 大腸菌複製オリジン  
Mu-DHFR 疫菌導入されたDHFR遺伝子  
Mu-NEO<sup>r</sup> 疫菌導入されたネオマイシン耐性遺伝子  
PCMV ヒトサイトメガロウイルス、Major Immediate-Early 抗原プロモーター  
P SV40DE 弱発SV40プロモーター (SV40複製オリジンを含む)  
SV40 pA SV40ポリアデニレーションシグナル  
合成リンカー配列

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 プラスミド中に、消耗性ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子シストロン、および、強発現誘導性プロモーターを有する遺伝子組み込み用マルチクロニングサイトを有し、哺乳動物宿主細胞において遺伝子組換えタンパク質の高生産性を誘導する発現ベクター。

【請求項2】 消耗性ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子シストロンが、プロモーターとして発現誘導性の低いプロモーターを使用し、かつ該プロモーターの配列とネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子翻訳領域との間にアミノ酸配列をコードし得る配列を少なくとも1組含んでなる挿入配列を有することを特徴とする請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項3】 消耗性ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子シストロンが、トリプレットの構成単位としての開始位置がネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子の翻訳領域開始位置と対応するアミノ酸配列をコードし得る配列を少なくとも一組含んでなる挿入配列を有することを特徴とする請求項2に記載の発現ベクター。

【請求項4】 消耗性ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子シストロンが、トリプレットの構成単位としての開始位置がネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子翻訳領域開始位置に対応するか、または1塩基もしくは2塩基ずれた位置にあるアミノ酸配列をコードできる配列のうち少なくとも2種類の配列を含んでなる挿入配列を有することを特徴とする請求項2に記載の発現ベクター。

【請求項5】 該挿入配列が人為的に合成されたリンカーであることを特徴とする請求項2～4のいずれか1項に記載の発現ベクター。

【請求項6】 該挿入配列が自然に存在する配列に由来するものであるか、またはそれを改変したものであることを特徴とする請求項2～4のいずれか1項に記載の発現ベクター。

【請求項7】 該挿入配列の少なくとも一部がトランスポゾン配列に由来することを特徴とする請求項6に記載の発現ベクター。

【請求項8】 発現誘導性の低いプロモーターとして、哺乳動物細胞では通常発現し難いタンパク質遺伝子のプロモーターを由来とするもの、哺乳動物には通常感染し難いウイルス抗原のもつプロモーター、またはそのいずれかのプロモーターからエンハンサー部分を除去したものを使用することを特徴とする請求項2～7のいずれか1項に記載の発現ベクター。

【請求項9】 タンパク質遺伝子を組み込んだ請求項1～8のいずれか1項に記載の発現ベクターを用いた遺伝子導入により宿主細胞を形質転換させることを含む、G418耐性細胞クローンであるタンパク質の高生産性形質転

換体を得る方法。

【請求項10】 該プラスミド中に、プロモーターとして、発現誘導性の低いプロモーターを使用したジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子シストロンを有し、哺乳動物宿主細胞としてジヒドロ葉酸還元酵素欠損CHO細胞を用い、該プラスミドの遺伝子の該宿主細胞への遺伝子導入後にメトトレキセートによる該プラスミドの遺伝子の効率的な増幅を可能にする請求項1～8のいずれか1項に記載の発現ベクター。

10 【請求項11】 ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子シストロンの発現誘導性の低いプロモーターとして、哺乳動物細胞では通常発現し難いタンパク質遺伝子のプロモーターを由来とするもの、哺乳動物には通常感染し難いウイルス抗原のもつプロモーター、またはそのいずれかのプロモーターからエンハンサー部分を除去したものを使用することを特徴とする請求項10に記載の発現ベクター。

20 【請求項12】 タンパク質遺伝子を組み込んだ請求項10または11に記載の発現ベクターを用いた遺伝子導入により宿主細胞を形質転換させることを含む、タンパク質の高生産性形質転換体を得る方法。

【請求項13】 タンパク質遺伝子を組み込んだ請求項1～8、10および11のいずれか1項に記載の発現ベクターを用いた遺伝子導入により宿主細胞を形質転換させ、得られた形質転換体を無血清培地へ馴化させることを含む、無血清培地で安定的に高水準のタンパク質生産をすることのできるタンパク質の高生産性形質転換体を得る方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

30 【発明の属する技術分野】本発明は、哺乳動物細胞を宿主として高水準に遺伝子組換えタンパク質生産を可能にする哺乳動物細胞用発現ベクターに関する。本発明の発現ベクターは、特に、大腸菌や酵母を宿主とした遺伝子組換えでは活性が得られ難いタンパク質の生産に適する。

## 【0002】

40 【従来の技術】組換えタンパク質生産に用いる発現ベクターは数多く開発されており、とくに大腸菌や酵母などの微生物を宿主とした発現系では高い収率が期待できる。しかしながら、これらの微生物を宿主とする発現系ではタンパク質の修飾に問題があったり、哺乳動物タンパク質に固有の特徴が失われたりすることがある。このため、例えば生物学的活性が糖鎖に依存するタンパク質の場合、哺乳動物細胞を宿主としてそのタンパク質を生産することが必要になる。こうした要請にも拘わらず、哺乳動物細胞を宿主とする組換えタンパク質発現系の生産性は一般に低く、導入遺伝子の安定性にも問題がある場合が多い。

50 【0003】哺乳動物細胞を宿主とした組換えタンパク質生産の事例は、組織性プラスミノーゲンアクチベータ(特開昭59-183693号公報;DNA, 7, 651頁, 1988年)、エリス

ロポイエティン(J. Fermentation Bioengineering, 4, 257頁, 1989年; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6465頁, 1986年; Biotechnology, 6, 67頁, 1988年)、IFN- $\gamma$  (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4564頁, 1983年)、IFN- $\beta$  (Cytotechnology, 4, 173頁, 1990年)などに見られる。また、モノクローナル抗体の遺伝子組換え生産に関しても数多くの報告がある(Biotechnology, 10, 169頁, 1992年; J. Immunol. Methods, 125, 191頁, 1989年; Biotechnology, 10, 1455頁, 1992年)。

#### 【0004】

【発明が解決しようとする課題】哺乳動物細胞を用いた組換えタンパク質の生産性を上げることがタンパク質性医薬品や診断薬などの製造において非常に重要である。さらに、それらの開発研究にも有効な手段を与える。そのため、哺乳動物細胞とくにチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)を宿主として、効率的な遺伝子導入および高生産性の獲得を可能にする発現ベクターが求められている。

【0005】効率的な遺伝子導入とは、組換え細胞全体に対して目的物質を有効に生産する細胞クローンの数が相対的に小さく、それにより高生産性クローンのセレクションが容易であること、一方目的とするタンパク質を生産する細胞のポピュレーションが小さいにも拘わらず高生産性クローンが出現する期待値が大きいことである。得られる細胞のポピュレーションが大きいとその分セレクションに時間と労力を要することになり効率が悪い。また潜在的に高い生産性をもつクローンを見落とす可能性も高い。

【0006】高生産性の獲得とは、遺伝子導入により得られた細胞クローンの組換えタンパク質の生産レベルが高いことであり、これはおもに発現ベクターの性質、性能に由来すると考えられる。遺伝子発現のレベルは染色体上の位置により著しく異なることが見出されている(Ann. Rev. Cell Biol., 6, 679頁, 1990年)。

#### 【0007】

【課題を解決するための手段】

【0008】本発明者らは、遺伝子導入により組み込まれる遺伝子のコピー数を大きくすることで高発現を達成するのではなく、宿主細胞染色体上の高発現位置にプラスミド遺伝子が組み込まれたものがネオマイシン耐性株として結果的にセレクトされる仕組みをもつ発現ベクターを開発した。遺伝子導入後のG418耐性株としての初期クローンの高生産性はネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ(以下、NEO<sup>r</sup>と記載する)遺伝子発現の仕組みに依存する。また、該発現ベクターはジヒドロ葉酸還元酵素(以下、DHFRと記載する)遺伝子をもち、その発現誘導性を工夫することにより薬剤刺激により効率的な遺伝子増幅を可能にする発現ベクターを開発した。結果、高水準で安定的なタンパク質の産生を可能にする発現ベクターを作製でき、本発明を完成した。

【0009】導入されるNEO<sup>r</sup>遺伝子の発現が起こらないかもしくは低すぎると、組換え体である宿主細胞はネオマイシン(以下、G418で代表する)に対する耐性を獲得することができない。しかしながら本発明者らがこれまでにに行った研究においては、市販のベクターを含みNEO<sup>r</sup>遺伝子をもつ発現ベクターを用いたすべてのケースにおいて非常に多くのG418耐性株が得られた。このような結果に基づき限り、プラスミドから供与されたNEO<sup>r</sup>遺伝子の発現は、トランスフェクションの結果得られた細胞が形質転換体であるかどうかの選択マーカーとしての役割以外には殆ど寄与していないと推定された。

【0010】本発明者らは、NEO<sup>r</sup>発現の仕組みをさらに制限的にすることにより、NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロンが宿主細胞染色体上の高発現位置に組み込まれない限りG418耐性獲得のために必要とするレベルのNEO<sup>r</sup>発現が起こらないように設計した。すなわち、NEO<sup>r</sup>遺伝子の発現性を極めて劣化・減衰させたものにより、組み込まれるプラスミド遺伝子が染色体上の極めて高い発現性をもつ位置に導入されない限り、形質転換体ではあっても培地中のG418セレクションに対して生存が困難であるようにした。発現ベクターのNEO<sup>r</sup>遺伝子シストロンに弱いプロモーターを使用した報告はいくつかあるが(Mol. Cell Biol., 3:1246頁, 1983年; Mol. Cell Biol., 6, 2593頁, 1986年; Mol. Cell Biol., 7, 1296頁, 1987年; DNA, 7, 651頁, 1988年)、これらの事例において高生産性の形質転換体が有効かつ十分に選択されているとは考え難い。

【0011】本発明は、NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロンの構成として、発現誘導性を低下させたプロモーターを使用し、かつ該プロモーターとNEO<sup>r</sup>遺伝子翻訳領域との間にアミノ酸配列をコードし得る配列を少なくとも1組合むことによりなるDNA配列を挿入(挿入配列)してもつこと、または、遺伝子導入により形質転換された宿主細胞におけるNEO<sup>r</sup>の発現機構を著しく消耗させ減衰せしめる点においてこれと同等の構成をもつことにより、遺伝子導入により形質転換された宿主細胞におけるNEO<sup>r</sup>の発現機構を著しく消耗させ減衰せしめるものである。本発明の、NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロンはプロモーターを弱化しただけのものとは異なり、高発現位置へプラスミド遺伝子が導入されたG418耐性株を特異的に獲得できるよう導くことから、「消耗性NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロン」と定義する。

【0012】すなわち、本発明は、プラスミド中に該消耗性NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロンおよび強発現誘導性プロモーターを有する発現ベクターを提供する。当該ベクターは、哺乳動物宿主細胞において遺伝子組み換えタンパク質の高生産性を誘導する。

【0013】該「消耗性NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロン」のプロモーターとしては、哺乳動物細胞では通常発現し難いタンパク質遺伝子のプロモーターを由来とするもの、哺乳動物には通常感染し難いウイルス抗原のもつプロモーター、またはそのいずれかのプロモーターからエンハンサ

一を除去したものを使用でき、より具体的には、CHO細胞に対して通常非感染性であるSV40のウイルス抗原プロモーターからエンハンサー領域を除去したものか(Mol. Cell Biol., 6, 2593頁, 1986年)またはこれと同等に発現性の充分に低いプロモーターを使用することが好ましい。また、挿入配列は例えば“トリプレットの構成単位としての開始位置がNEO<sup>r</sup>遺伝子翻訳領域開始位置に対応するアミノ酸配列をコードし得る配列”を少なくとも1組含んでなる。該挿入配列として好ましくは“トリプレットの構成単位としての開始位置がNEO<sup>r</sup>遺伝子翻訳領域のもの1塩基または2塩基ずれた位置にあるアミノ酸配列をコードし得る配列”をも含み、そのうち少なくとも2種類を有することが望ましく、さらに好ましくはこれら3種類をすべて含んでなることが望ましい。該挿入配列としてのDNA配列には、こうした条件をもとに人為的に合成したリンカーを使用できるが、自然に存在する配列で条件に合致するものがあればそれを由来とするものまたはそれを改変したものを用いても良い。例えば、トランスポゾンTn5(Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 45, 107頁, 1981年)などのトランスポゾン配列中にはトリプレットの構成単位としてそれぞれ開始位置の異なる3種類のアミノ酸配列をコードし得る配列がすべて含まれており、その配列中の適当な領域を使用することにより該条件を満足するものを作製することが可能である。該挿入配列の長さは、NEO<sup>r</sup>の発現を低下させるのに十分なものであればよく、アミノ酸配列をコードし得る配列が何組含まれているかによって変わるものであるが、通常には30～1000塩基、好ましくは100～400塩基である。また、NEO<sup>r</sup>遺伝子翻訳領域開始位置前後(具体的には(-6), (-3), (+4))のコザック共通配列(Nucleic Acids Res., 15, 8195頁, 1987年)に該当する位置の塩基はピリミジン塩基であるか、またはピリミジン系塩基に改変されていることが望ましい。

【0014】プラスミドDNAの宿主細胞染色体上の強発現性位置への組み込みはNEO<sup>r</sup>遺伝子シストロンのもつ特性からG418セクションにより結果的に達成されることになるが、染色体上の当該位置における目的タンパク質の発現自体は強力に誘導される必要がある。このため、タンパク質遺伝子を組み込むマルチクロニングサイト(以下、MCSと記載する)のプロモーターおよびポリAデニレーションシグナル(以下、polyAと称する)には最も強い発現誘導性をもつものの中から選択する。プロモーターとしては、ヒトサイトメガロウイルスImmediate Early(hCMV MIE:Cell, 41, 521頁, 1985年)プロモーター、 $\beta$ -アクトチンプロモーター(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4831頁, 1987年)、polyAシグナルにはウシ成長ホルモン由来のpolyA配列(DNA 5, 115頁, 1986年)等があげられる。本明細書中ではこの目的とするタンパク質遺伝子を組み込むMCSをもつシストロンを「MCSシストロン」と称する。

【0015】本発明は、また、タンパク質遺伝子を組み込んだ上記の発現ベクターを用いた遺伝子導入により宿主細胞を形質転換させることを含む、G418耐性細胞クローンであるタンパク質の高生産性形質転換体を得る方法を提供する。

【0016】本発明ベクターは好ましくはまたDHFR遺伝子シストロンを有する。このベクターは、哺乳動物宿主細胞としてジヒドロ葉酸還元酵素欠損CHO細胞を用い、該プラスミドの遺伝子の該宿主細胞への遺伝子導入後にメトトレキセートによる該プラスミドの遺伝子の効率的な増幅を可能にする。

【0017】DHFR遺伝子シストロンにおいては、NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロンに使用するものと同様に発現誘導性を低下させたプロモーター、例えばCHO細胞に対して通常非感染性であるSV40のウイルス抗原プロモーターからエンハンサー領域を除去したものを用いる。より好ましくはDHFR遺伝子翻訳領域開始位置前後のコザック共通配列に該当する位置の塩基がピリミジン塩基であるか、またはピリミジン系塩基に改変されていることが望ましい。遺伝子増幅を促進するためには、導入するDHFR遺伝子に変異を導入することによりメトトレキセート(以下、MTXと記載する)への親和性を低下させる方法が知られている(特開昭59-192089号公報)が、本発明者らはDHFR遺伝子の発現誘導性を弱くするかまたは抑制的にしておくことにより、培地中に含まれるMTXが宿主細胞染色体に組み込まれたプラスミドDNAの増幅を促すよう導く方がより効果的と考えた。

【0018】本発明は、また、タンパク質遺伝子を組み込んだ上記DHFR遺伝子シストロンも有する発現ベクターを用いた遺伝子導入により宿主細胞を形質転換させることを含む、タンパク質の高生産性形質転換体を得る方法を提供する。

【0019】本発明は、さらに、タンパク質遺伝子を組み込んだ上記の発現ベクターを用いた遺伝子導入により宿主細胞を形質転換させ、得られた形質転換体を無血清培地へ馴化させることを含む、無血清培地で安定的に高水準のタンパク質生産をすることのできるタンパク質の高生産性形質転換体を得る方法を提供する。

【0020】本発明は、また、上記のDHFR遺伝子シストロンおよび強発現誘導性プロモーターを有する遺伝子組み込み用マルチクロニングサイトを有する発現ベクターを提供する。この発現ベクターは上記消耗性NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロンを有する発現ベクターの構築のために使用できる。

【0021】本発明において「発現誘導性の低いプロモーター」とは、タンパク質発現のために一般的に使用されているプロモーター、例えばSV40プロモーター、LTRプロモーター、 $\beta$ アクトチンプロモーターなどにより誘導される場合に較べてタンパク質の発現が弱いプロモーターを意味している。「アミノ酸をコードし得る配列」と

は、対応する開始コドンと終始コドンをもちその間にペプチドをコードできる遺伝子配列をもつものであって、好ましくは構成するアミノ酸の数が20前後あるいはそれ以上あるのが望ましい。「シストロン」とは、プロモーター、構造遺伝子、ポリアデニレーションシグナル(polyA)を基本構成とする転写・翻訳によりタンパク質を発現する単位を意味するが、これらのいずれかに関連するかもしくは任意のDNA配列を挿入配列として含んでも良い。「強発現誘導性プロモーター」とは、通常の発現ベクターにおいて、タンパク質発現のために一般的に使用されているプロモーターを意味し、好ましくは、特に発現誘導性が高いヒトサイトメガロウイルスMajor Immediate-Early抗原プロモーター、 $\beta$ -アクトチンプロモーターなどのプロモーターを意味する。

#### 【0022】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明発現ベクターは、バックボーンベクター上に、NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロン、MCSシストロンを組み込むことによって、また、さらにDHFR遺伝子シストロンを組み込むことによって得ることができる。バックボーンベクターとしての制限は特になく、例えば、大腸菌複製オリジン(ColE1 ori)およびアンピシリン耐性遺伝子を有するプラスミドベクター(pUC系:Gene, 33:103頁, 1985年、pBR322等:Gene, 22, 277頁, 1983年)が使用できる。

【0023】本発明のベクターの使用法として、タンパク質遺伝子を本発明のベクターのMCSに組み込んだ後、リポフェクチン法またはエレクトロポレーションにより宿主細胞に遺伝子導入を行い、G418に対する耐性だけでセクションを行い、タンパク質の高生産性形質転換体を得る方法が挙げられる。セクションで生存した細胞の多くは既に相対的に高い発現レベルを達成しているが、その中からさらに高い生産性をもつ細胞を選択するためタンパク質の発現レベルをアッセイしてもよい。得られた高生産性細胞はクローニングを繰り返した後、継代して安定化させる。さらに高生産性株を得たい場合は、本発明のベクターとしてDHFR遺伝子シストロンも有するベクターを使用し、培地中にMTXを加え、宿主細胞内に組み込まれたDHFR遺伝子を刺激することにより遺伝子増幅を行う。一般にMTXはDHFR遺伝子の増幅だけでなく、単独あるいはネオマイシンと併せて遺伝子組み込み細胞のセクションに用いられるが(J. Mol. Appl. Gene t., 1, 165頁, 1981年; J. Mol. Biol., 159, 601頁, 1982年)、本発明ではNEO<sup>r</sup>遺伝子とDHFR遺伝子の役割は分担するものとした。すなわち、NEO<sup>r</sup>はセクションのためのものであり、DHFRは組み込まれたプラスミドベクター遺伝子を増幅するためのものとした。

【0024】以下、本発明発現ベクターの製造方法を具体例を挙げて説明する。なお、この具体例で用いられる出発プラスミド、プロモーター等の構成要素を同等のもので置き換えて実施することは当業者にとって容易であ

る。

【0025】<1>バックボーンベクター[pBBV]の作製  
バックボーンベクターpBBVは、プラスミドpUC18(Gene, 33, 103頁, 1985年)のlacZ領域を完全に取り除き、開裂部位を新しく合成したマルチプルな制限酵素切断サイトを有するリンカー(BBVリンカー)で置換することにより制作する。pBBV作製のフローチャートを図1に示す。pBBVは、大腸菌複製オリジン(ColE1 ori)とアンピシリン耐性遺伝子(Amp<sup>r</sup>)を有する。

10 【0026】<2>遺伝子クローニング用プラスミドの作製

(a) SV40関連遺伝子クローニング用プラスミド[pCV3]の作製

プラスミドpUC119(Gene, 33, 103頁, 1985年)のもつマルチクローニングサイトを、新しく合成したマルチプルな制限酵素切断サイトを有するリンカー(CV3リンカー)で置換することにより作製する。pCV3作製のフローチャートを図2に示す。

20 【0027】(b) MCSシストロンをもつ遺伝子クローニング用プラスミド[pCV4]の作製

プラスミドpUC18の既存のマルチクローニングサイトを除去して、新しく合成したマルチプルな制限酵素切断サイトを有するリンカー(CV4リンカー)で置換することにより作製する。これは、MCSシストロンの作製過程で用いる構築用プラスミドである。pCV4作製のフローチャートを図3に示す。

【0028】<3>カセット構築用プラスミド[pSVP(D)S-1, pSVP(D)S-2]の作製

30 DHFR遺伝子シストロンをもつプラスミドおよびNEO<sup>r</sup>遺伝子シストロンをもつプラスミドを作製するために、あらかじめプロモーターとポリアデニレーションシグナル(polyA)の間にマルチクローニングサイトを有するカセット構築用プラスミドを作製する。DHFR遺伝子シストロン用としてpSVP(D)S-1、NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロン用としてpSVP(D)S-2を作製する。基本構成は共通で、プロモーターとしてSV40由来の初期プロモーター(SV40複製オリジンを含む)を改変したもの、ポリアデニレーションシグナルとしてSV40 polyAを採用する。これらをあらかじめ用意されたSV40関連遺伝子クローニング用プラスミドpCV3に組み込むことにより作製する。DHFR用とNEO<sup>r</sup>用との違いはSV40プロモーターの5'末端の制限酵素切断配列が一部異なるだけである。pSVP(D)S-1作製のフローチャートを図4に、pSVP(D)S-2作製のフローチャートを図5に示す。

【0029】(3-1) DHFR遺伝子シストロン構築用プラスミドpSVP(D)S-1の作製

(a) プロモーターの選択

ウイルス抗原プロモーター領域からエンハンサー部分を取り除くことによりプロモーターを弱化することができるとの報告をもとに(Mol. Cell Biol., 3, 1246頁, 1983

年; Mol. Cell Biol., 6, 2593頁, 1986年; Mol. Cell Biol., 7, 1296頁, 1987年), SV40初期プロモーターのエンハンサー部分を除去することにより発現誘導性の低いプロモーターを作製する。具体的には、SV40複製オリジン(ori)を含む初期プロモーター配列を改変して使用する。すなわち、pBR322上にBamHIでライゲートしたSV40ウイルス全DNAをもつプラスミドpSB40/BR(広島大学より入手)から、配列番号8および9に示す塩基配列を有するプライマーを用いてSV40初期プロモーター配列を切り出し、プラスミドpCV3のSacII-PstIサイト間に組み込む。続いてこの配列中に存在する72bp繰返配列中にそれぞれあるSphI間(SphI-SphI)をセルフライゲーションすることによりエンハンサー部分を除去し(Mol. Cell Biol., 3, 1246頁, 1983年)、該プロモーターを弱化させる。弱化させたプロモーターをP<sub>SV40DE</sub>、作製されたプラスミドをpSVPlaと称する。

【0030】(b) polyAシグナル配列の選択と設定  
SV40ウイルスゲノム由来のpolyAシグナルを有するプラスミドpSV40pA-A(pSV40/BR由来, 広島大学より入手)から810塩基を切り出して使用する。発現ベクターにおけるSV40 polyAは、一般的にはターミネーションシグナルを含むことを条件に短いものを使用する傾向にあるが、他のシストロンへの影響を避けるために充分な長さの配列を設定するとよい。この配列の3'末端の制限酵素切断配列は新しく合成したリンカー(SPSV40リンカー)により変更した後(変更後のプラスミドはpSV40pA-B)、BamHIおよびClaIで切り出してpSVP1aに組み込むことにより、DHFR遺伝子シストロン構築用プラスミドpSVP(D)S-1を作製する。

【0031】(3-2)NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロン構築用プラスミドpSVP(D)S-2の作製

(a) プロモーターの選択

プロモーター配列には、DHFR遺伝子シストロンに使用したものと同じくSV40プロモーターを弱化させたP<sub>SV40DE</sub>を採用する。これはDHFR用と同じ手順でpSV40/DRから切り出されるが、5'センスプライマーとしては制限酵素切断配列の一部(EcoRI)が省略されたもの(配列番号7)を合成して使用する。プロモーター配列からのエンハンサー部分除去もDHFR遺伝子シストロンの場合と同様の方法で行い、作製されたプラスミドをpSVP1bとする。

【0032】(b) polyAの選択と設定

polyAについても、DHFR用の場合と同じ方法でpSV40pA-BからBamHIおよびClaIで切り出してpSVP1bに組み込むことにより、NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロン構築用ベクターpSVP(D)S-2を作製する。

【0033】<4>NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロンをもつカセットベクター[pSVP(D)S/NEO]の作製

(4-1)「消耗性NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロン」を作製するための挿入配列の調製

(a) トランスポゾン由来配列の利用

NEO<sup>r</sup>遺伝子の発現機構を消耗させるため、プロモーターとNEO<sup>r</sup>遺伝子翻訳領域の間に任意のアミノ酸配列をコードし得る配列を少なくとも1組好ましくはトリプレットの構成単位としての開始位置が異なる3種類すべてを含んでなる挿入配列をもつが、発明者らは自然に存在する配列であるトランスポゾン配列(Tn5: Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 45, 107頁, 1981年; Gene, 18, 327頁, 1982年)を由来とする配列中にこの挿入配列としての条件を満足する領域があることを見いだした。本発明中の実施例のベクターで使用した354塩基からなるトランスポゾン配列部分にはいくつものアミノ酸配列をコードし得る遺伝子配列、すなわち開始コドンと見なし得る“ATG”が出現する(合計7個あり、内6個は該配列中に対応する終止コドンを有し、最も下流にある翻訳領域から数えて(-16)の位置から始まる7個目の“ATG”にはNEO<sup>r</sup>遺伝子翻訳領域の開始コドン直後の“ATGATTGA(下線部分)”が終止コドンとして対応し完結する)。また、この配列中には、トリプレットの構成単位として開始位置の異なる3種類すべてのアミノ酸配列をコードし得る配列が含まれている。従って、トランスポゾン配列はNEO<sup>r</sup>遺伝子翻訳領域5'末端から上流に数えて270bpないし190bp程度を採用すれば良いが、短い場合でも少なくとも80bp程度はあるのが望ましい。また、3'側末端の配列はNEO<sup>r</sup>遺伝子の開始コドンの3つ前(-3)の塩基が“C”、6つ前(-6)の塩基が“T”であって、共にピリミジン系塩基でありコザック共通配列(Nucleic Acids Res., 15, 8195頁, 1987年)には該当しない。従ってこのトランスポゾン配列はP<sub>SV40DE</sub>とNEO<sup>r</sup>タンパク質をコードする遺伝子との間に位置することにより、NEO<sup>r</sup>遺伝子の発現機構を効果的に消耗させ減衰させることができると考えられた。

【0034】(b)挿入配列としての人工リンカーの調製  
挿入配列としては人為的にリンカーを合成して使用することもできる。この場合トリプレットの構成単位としての開始位置の異なる3種類すべてのアミノ酸配列をコードする配列を含むよう、また各々の長さは20アミノ酸程度またはそれ以上の長さのものになるように設計する。各々のアミノ酸配列は必ずしも直列である必要は無くオーバーラップした共有部分をもっても良い。このリンカーをP<sub>SV40DE</sub>とNEO<sup>r</sup>遺伝子翻訳領域との間に挿入することにより、NEO<sup>r</sup>遺伝子の発現を効果的に減衰させることができると考えられる(以下、このリンカーを挿入リンカーとして記載する)。この合成リンカー挿入配列を用いる実施の形態は後述の<8>に記載する。

【0035】(4-2) pSVP(D)S/NEOの構築

(a) トランスポゾン由来配列を利用する場合

NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロンをもつカセットベクターは、P<sub>SV40DE</sub>(プロモーター)、挿入配列(トランスポゾン由来配列)、NEO<sup>r</sup>遺伝子翻訳領域配列およびSV40 polyAで構成する。pSVP(D)S-2にはP<sub>SV40DE</sub>とSV40 polyAがすでに組み込まれていることから、この間にTn5由来のNEO<sup>r</sup>遺

伝子を含むトランスポゾン配列を組み込む。Tn5配列は一般的に利用されているpSV2-neo(J. Mol. Appl. Genet., 1, 327頁, 1982年)に含まれているため、これをもとに切り出して使用する。pSV2-neoの場合はNEO<sup>r</sup>遺伝子を含むトランスポゾン配列を強い発現誘導性を持つSV40プロモーターとの組み合わせで使用しており、本発明での利用法とは全く共通性がない。pSVP(D)S/NEO作製のフローチャートを図7に示す。

【0036】(b) 人為的な合成リンカー挿入配列を使用する場合

pSVP(D)S-2にはP<sub>SV40DE</sub>とSV40 polyAがすでに組み込まれていることから、この間に挿入配列としての合成リンカーを組み込むことにより作製できる。また、本発明の実施例のように、トランスポゾン由来配列を挿入配列としてもつよう最終的に作製された発現ベクターpNOW/CMV-Aを使用し、トランスポゾン配列部分を合成リンカー配列に置き換えることにより、発現ベクターpNOW/CMV-AAを作製することもできる。

【0037】(4-3) NEO<sup>r</sup>遺伝子翻訳配列への変異導入  
NEO<sup>r</sup>遺伝子の翻訳開始部分を好ましくは典型的なKozak非共通配列にするために、開始コドン“ATG”直後の塩基をポイントミューテーションでピリミジン系塩基である“C”または“T”に変更する(実際には“C”に変更した)。これによりNEO<sup>r</sup>遺伝子のMetの次のアミノ酸は、IleからLeuまたはPheに変更される。この変異導入後のNEO<sup>r</sup>遺伝子をMu-NEO<sup>r</sup>遺伝子と称する。トランスポゾン配列およびMu-NEO<sup>r</sup>遺伝子からなる配列を配列番号26に示す。

【0038】<5> MCSシストロンをもつカセットベクター[pEXP-BL2]の作製

MCSシストロンは、プロモーター、目的とするタンパク質遺伝子組み込み用マルチクロニングサイト(MCS-B)およびpolyAで構成する。プロモーターには、最も強力な発現誘導性をもつプロモーターの一つとされているhCMV MIE抗原プロモーターを由来として使用する(P<sub>CMV</sub>)。また、polyAシグナルにも高生産性でかつ再現性に優れているとの報告のあるウシ成長ホルモンpolyAシグナル(bGH polyA)を採用する。MCSシストロンをもつシストロンベクターpEXP-BL2の作製のフローチャートを図8に示す。

【0039】(a) P<sub>CMV</sub>プロモーターの設定範囲

P<sub>CMV</sub>の配列は、hCMV MIE抗原のプロモーター／エンハンサー領域を含む約6kbの配列をpSV2-Neoに組み込むことにより作製されたプラスミドpSV2-Neo/EcoH(東海大より入手)由来である。P<sub>CMV</sub>の範囲は、hCMV MIE遺伝子中で21b, 19b, 18b, 17bの繰り返し配列を全て含むプロモーター／エンハンサー領域とし、配列番号16および17に示す塩基配列を有するプライマー(末端に制限酵素切断配列5':EcoRV、3':ClaIを付けたもの)を用いて切り出し、MCS関連遺伝子クロニング用プラスミドpCV4のEcoRV-ClaIサイト間に組み込む。作製されたプラスミドをpCV4/

CMVと称する。

【0040】(b) polyAの選択

ウシ肝細胞を由来とするゲノムDNAから、bGH polyAを調製する。文献(Gene, 11, 291頁, 1987年)ではポリアデニレーションシグナル配列のうちPvuIIとKpnIで切り出せる229bpを用いて高い生産性でかつ再現性のある結果を得ているが、この間の配列中にターミネーター(“AATAAA”)は1回出現する。基本的にpolyAは1つで充分と考えられるが、MCSシストロンをさらに安定化シターミネーションが強くかかるようにプラスミドpCV4/CMV中にbGH polyAが二重の配列になるように組み込んでも良い((bGH polyA)<sup>2</sup>: 配列番号27)。

【0041】(c) MCSシストロンをもつプラスミド[EXP-BL2]

こうして作製されたプラスミド(pEXP-BL2)においては、P<sub>CMV</sub>の3'末端制限酵素サイトと(bGH polyA)<sup>2</sup>の5'末端の制限酵素サイトの間に、目的とするタンパク質遺伝子を組み込むためのマルチクロニングサイト(MCS-B)が存在する。すなわち、5'-ClaI-NotI-KpnI-XbaI-3'が利用できる。組み込むタンパク質遺伝子が開始コドンから始まる場合には、5'側に直接つける制限酵素サイトとしてはClaIまたはKpnIを選択するのが望ましい。

【0042】<6> DHFR遺伝子シストロンをもつカセットベクター[pSVP(D)S/DHFR]の作製

DHFR領域は、P<sub>SV40DE</sub>(プロモーター)、DHFR遺伝子およびSV40 polyAより成る。P<sub>SV40DE</sub>とSV40 polyAはすでにpSVP(D)S-1に組み込まれており、これにDHFR遺伝子配列を組み込むことにより作製する。pSVP(D)S/DHFR作製のフローチャートを図6に示す。

【0043】DHFR遺伝子は、マウス繊維芽細胞3T3(J. Biol. Chem., 256, 9501頁, 1981年)を由来として、開始コドンの5'上流6bから終止コドンの3'下流約85bまでの範囲をPCRプライマーで切り出す。5'側は開始コドンの直前の6塩基“GCCATC”の“G”および“A”からピリミジン系塩基に改変し(例えば、“TCCCTC”)、さらにその5'側にPstIサイトをもちょうに調製する。3'側は終止コドンの下流85bにあるBgIIIサイトまでとする。このPCRプライマーにより、DHFR遺伝子の開始コドンの5'側の(-6)、(-3)および開始コドン直後(+4)の塩基はオリジナルにはコザック共通配列であるが、それぞれピリミジン系塩基に改変することにより非共通配列を形成する。これによりDHFRタンパク質の開始コドンの次のアミノ酸はValからLeuまたはPheに変更される。この変異導入されたDHFR遺伝子をMu-DHFRとし、その塩基配列を配列番号25に示す。

【0044】<7>発現ベクター[pNOW/CMV-A]の作製  
予め用意された発現ベクター構築用のバックボーンベクターpBBVに、同一の転写方向にNEO<sup>r</sup>領域(NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロン)、目的物質組込領域(MCSシストロン)およびDHFR領域(DHFR遺伝子シストロン)の順で組み込むことにより作製する。方法は以下の通りである。SVP(D)S/DHFRか

らEcoRIおよびApaIでDHFR遺伝子シストロンを切り出し、バックボーンベクターpBBVのマルチクローニングサイトのEcoRI-ApaIサイトにライゲートすることによりプラスミドベクターpNOW-1を作製し、pSVP(D)S/NEOからClaIおよびSacIIでNEO遺伝子シストロンを切り出し、pNOW-1のマルチクローニングサイトのClaI-SacIIサイトにライゲートし、その後ClaIサイトをつぶしてプラスミドpNOW-2を作製し、pEXP-BL2からSplIおよびEcoRVでMCSシストロンを切り出し、pNOW-2のマルチクローニングサイトのSplI-EcoRVサイトにライゲートすることにより発現ベクターpNOW/CMV-Aを作製する。pNOW/CMV-A作製のフローチャートを図9に、マップを図10に示す。

【0045】<8>合成リンカー挿入配列をもつ発現ベクター[pNOW/CMV-AA]の作製

完成したpNOW/CMV-Aをもとに、[トランスポゾン配列からMu-NEO<sup>r</sup>配列に続く配列部分]を[合成リンカー挿入配列とMu-NEO<sup>r</sup>配列を接続した配列]に置換する。

【0046】(a)合成リンカーの作製

トリプレットの構成単位として開始位置の異なる3種類のアミノ酸配列をコードできる配列をすべて含む遺伝子配列を調製するために、それぞれ約50塩基からなる2つのリンカー(MSR-Linker 1(+), MSR-Linker 2(-))およびそれらの相補配列(MSR-Linker 1(-), MSR-Linker 2(+))を合成する。これらのリンカーをPCR増幅させ、MSR-Linker 1(+)の末端の“CCAAGC”と相補的に対応するMSR-Linker 2(-)の末端“GGTTCG”とにより接続する。接続された合成リンカー(配列番号29)は、5'側にPstIサイト、3'側にEcoRVサイトをもつ。

【0047】(b)トランスポゾン配列から合成リンカー挿入配列への置換

次いで、pNOW/CMV-Aを使用して、別途に合成したプライマーを使用しMu-NEO<sup>r</sup>の5'側から数えて7塩基上流から終始コドンまでを切り出す。接続した合成リンカーの3'末端およびMu-NEO<sup>r</sup>の5'末端にはEcoRVが付けられており、これを接続することにより挿入配列としての合成リンカーとMu-NEO<sup>r</sup>を接続した配列を作製する。pNOW/CMV-Aからトランスポゾン配列だけを切り出して置換するための適当な制限酵素切断サイトがないため、準備した[合成リンカー挿入配列とMu-NEO<sup>r</sup>配列を接続した配列]を用いて、対応するpNOW/CMV-Aの[トランスポゾン配列からMu-NEO<sup>r</sup>配列に続く配列]を置換する。いずれも5'側にPstIサイト、3'側にEcoRVをもつため、pNOW/CMV-AをPstI, EcoRVで開裂後、同じ制限酵素を用いて[合成リンカー挿入配列とMu-NEO<sup>r</sup>配列を接続した配列]をライゲートする。新しく作製される、消耗性NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロンの挿入配列が合成リンカーであることを特徴とする発現ベクターをpNOW/CMV-AAとする。pNOW/CMV-AA作製のためのpSVP(D)S/NEO-A作製のフローチャートを図11に示す。以下、図9にフローチャートを示す作製方法において、pSVP(D)S/NEOの代わりにpSVP(D)S/NEO-Aを使用すること

によりpNOW/CMV-AAを作製する。また、pNOW/CMV-AAのマップを図12に示す。

【0048】次に、本発明発現ベクター(pNOW/CMV-AおよびpNOW/CMV-AA)の利用方法について説明する。本発明ベクターは以下の手順によって使用できる。

【0049】(1)目的物質(タンパク質)の遺伝子をクローニングした後、(2)本発明発現ベクター(プラスミドベクターpNOW/CMV-AまたはpNOW/CMV-AA)のMCSに組み込む。(3)組み込まれた該発現ベクターを増殖させた後、(4)CHO細胞(DHFRネガティブ)にリポフェクション法またはエレクトロポレーションで遺伝子導入し、(5)培地中にG418を加え培養することによりG418耐性細胞をセレクトする。(6)得られた細胞を培養しながらクローニングを繰り返し、(7)目的物質の産生量の高いクローンを選択し、(8)さらに増殖速度が速くなり安定化するまで培養を継続する。(9)安定化したクローンの培地をFCS添加培地から漸次FCS量を下げ、無血清培地への馴化を行う。(10)高生産性のクローンに対して、培地中にMTX(10nM-1μM)を段階的にくわえることにより導入されたプラスミド遺伝子を増幅させ、(11)改めて高生産性クローンを選択し、(12)さらに増殖速度が早くなり安定化するまで培養を継続する。(13)安定化したクローンの培地をFCS添加培地から漸次FCS量を下げ、無血清培地への馴化を行う。なお培地の無血清化は(9)と(13)のいずれの段階で行ってもよい。

【0050】以下、本発明発現ベクターの使用例について説明する。

<1>発現ベクターpNOW/CMV-AAによるコングルチニン産生試験

(a)コングルチニン遺伝子導入とG418耐性初期クローンの確立

目的物質として、血清レクチンの一種であるウシコングルチニンを選択した。このタンパク質の活性には糖鎖が必要であり、大腸菌や酵母を宿主とした生産には適さない。ウシコングルチニンの遺伝子をクローニングしpNOW/CMV-AAのマルチクローニングサイトに組み込んだ後、DHFR欠損CHO細胞株(Dr. Gail Urlaubから譲受)にリポフェクション法により遺伝子導入した。培地にG418を加え培養したところ、960ウェル中33ウェルにのみ細胞の生存が見られた(G418耐性株)。生存細胞のほとんどはコングルチニンを有意に高いレベルで産生していたが、これらのうちから生産性の高い細胞として5クローンを選び継代培養したところすべてが7.0μg/ml(4日間)を示し、最も高い産生レベルを示したものの11.8μg/mlであった。これは文献等で報告されている代表的な発現ベクターによる遺伝子増幅前の初期クローンのデータと比較して最も高い水準であった(DNA, 7, 651頁, 1988年; Biotechnology, 10, 1455頁, 1992年; Biotechnology, 8, 662頁, 1990年; Gene, 76, 19頁, 1989年; Biotechnology, 9, 64頁, 1991年)。遺伝子増幅による組換え細胞のスクリーニングには通常6ヶ

月から1年を要しかつ培養条件や増幅刺激剤濃度による差異が大きい、発現ベクターのプライマリーな性能比較は増幅前の初期クローンの発現レベルで行うのが適当と考えられる。これにより本発明の発現ベクターの性能は極めて高いことが判明した。この結果、「消耗性NEO<sup>®</sup>遺伝子シストロンをもつ発現ベクター」は、得られるG418耐性株の数が極めて低い一方、非常に高い効率で目的物質タンパク質の高生産性細胞株の確立を可能にすることが確かめられた。本発明者らは市販の哺乳動物細胞用発現ベクターや独自に開発した発現ベクターを用いてこれまで数多くの試験を行ってきたが、コングルチニン発現量はいずれも最高50ng/ml(4日間)までであり、実用的とは言えなかった。これにより、本発明発現ベクターは非常に高いタンパク質発現レベルを可能にすることが証明された。

【0051】<2>発現ベクターpNOW/CMV-Aによるコングルチニン産生試験

(a)コングルチニン遺伝子導入とG418耐性初期クローンの確立

<1>と同様の方法で、ウシコングルチニンの遺伝子をpNOW/CMV-Aのマルチクローニングサイトに組み込んだ後、DHFR欠損CHO細胞株にリポフェクシン法により遺伝子導入した。10%FCSを添加した培地にG418を加え培養したところ、960ウェル中48ウェルに細胞の生存が見られ(G418耐性株)、これら生存細胞のほとんどがコングルチニンを有意に高いレベルで産生していた。クローニングを繰り返しながら培養を継続したところ、1μg/ml(4日間)を越える高水準のコングルチニン産生クローンが多数得られ、うち最も高い産生レベルを示したものは6.8μg/mlであった。従って、トランスポゾン配列を由来とするような天然型の配列でも挿入配列としての条件を満たしていれば、高生産性のG418耐性株を獲得できることが証明された。この実験では、細胞株の安定化後培地中のFCSレベルを下げ無血清培地であるCHO-S-SFM II培地(GIBCO社、ハイポキサンチンとチミジンが含まれていない)への馴化を行ったところ、充分に適応することが判明しコングルチニンの生産性にも有意な低下は認められなかった。

【0052】(b)G418耐性細胞株の遺伝子増幅

G418耐性細胞株のうち、コングルチニン産生が最も高かったクローンを継代培養し安定化させた後に、MTXによる遺伝子増幅を行った。始めに10nMのMTXを含む培地で2週間培養後、50nMのMTXを含む培地でさらに2週間増幅させたところ、コングルチニンの産生レベルは培地当たり18.6μg/ml(4日間)に上昇した。遺伝子増幅に用いるMTX濃度は一般に10nM~10μMの間の多段階とされ、最終濃度としては1μMがよく用いられるが、細胞に対する毒性の問題から高濃度暴露は安定な組換え細胞株の樹立には問題がある。このため低濃度MTXで高生産性が達成できることも重要な評価基準となり、本実験では50nMまでとし

た。また通常セレクションを含めたMTX暴露期間は6-12ヶ月とされるのに対して、本実験では約4週間で行った。こうした実験条件にも拘わらず有効なコングルチニンの産生量増加がみられ、遺伝子増幅系に関しても本発明ベクターの高い性能が確かめられた。多くの論文が示唆するように、毒性がほとんど問題とならない範囲(<1μM)でMTXの濃度レベルを上げるかまたはMTX暴露時間を長くすることによりさらに高い生産性が期待できる。

【0053】

10 【実施例】以下、本発明の実施例を説明する。

【0054】

【実施例1】(1)バックボーンベクターpBBVの作製  
プラスミドpUC18に新たに組み入れるマルチクローニングサイト用のリンカー(BBVリンカー)として、配列番号1に示す塩基配列を有するセンスDNAと配列番号2に示す塩基配列を有するアンチセンスDNAを合成した。このリンカーの制限酵素切断配列は、3'-NdeI-SacII-ClaI-EcoRV-SplI-EcoRI-ApaI-5'とし、5'末端は平滑末端(Blunt End)とした。プラスミドpUC18(宝酒造株式会社、1ng(0.1μl))を制限酵素NdeIおよびPvuIIで処理することによりlacZをコードする領域を完全に除去した。この溶液に対して、BBVリンカーのセンスDNAとアンチセンスDNAをそれぞれ100pmole加え、ついでDNAライゲーションキットVer.2(宝酒造株式会社)のI液2.0μlを加え、16℃で30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE(STRATAGENE社)0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で60秒間熱ショックを加えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地(東洋紡株式会社)を0.9ml加え、37℃で1時間シェーカーで振盪培養した。5,000rpmで1分間遠心分離し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱したコンピテントセルを懸濁して1:10の割合で2枚の100μg/mlのアンピシリンを含むアンピシリンプレートにまいた。37℃で一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち新たにBBVリンカーのDNAが挿入されているものを選び出しpBBVとした。

【0055】(2)SV40関連遺伝子クローニング用プラスミドpCV3の作製

プラスミドpUC119のマルチクローニングサイトを除去して新たに組み入れるマルチクローニングサイト用のリンカー(CV3リンカー)として、配列番号3に示す塩基配列を有するセンスDNAと配列番号4に示す塩基配列を有するアンチセンスDNAを合成した。このリンカーの制限酵素切断配列は、5'-HindIII-SacII-PstI-BamHI-ClaI-3'とし、3'末端はBlunt Endとした。プラスミドpUC119(宝酒造株式会社、1ng(0.1μl))を制限酵素HindIIIおよびEcoRIで処理した。得られたプラスミドを含む溶液に対して、CV3リンカーのセンスDNAとアンチセンスDNAをそれぞれ100pmole加え、次いでDNAライゲーションキットVer.2のI液2.0μlを加え、16℃で30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE0.1mlに加

え、氷上で30分間反応させた後、42℃で60秒間熱ショックを加えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地を0.9ml加え、37℃で1時間シェーカーで振盪培養した。5,000rpmで1分間遠心分離し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱したコンピテントセルを懸濁して1:10の割合で2枚の100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むアンピシリプレートにまいた。37℃で一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち新たにCV3リンカーのDNAが挿入されているものを選び出しpCV3とした。

【0056】(3) 弱化SV40プロモーター(P<sub>SV40DE</sub>)の作製

(a) 弱化SV40プロモーター(DHFRシストロン用)の作製  
プラスミドpSV40/BRからSV40 Oriを含むSV40初期プロモーターを切り出すため、配列番号5に示す塩基配列を有する5' センスプライマー(PS1)と配列番号6に示す塩基配列を有する3' アンチセンスプライマー(PS2)を合成した。PS1プライマーの5' 側末端には、元の配列のPvuIIサイトを変更してSacII-EcoRIの制限酵素サイトを付与した。また、PS2プライマーの3' 側末端には、元のHindIIIサイトを変更してPstIサイトを付与した。pSV40/BRゲノム(pSV40/BR由来、広島大学より入手)1ng(0.1  $\mu$ l)に対して、これらのPS1プライマーとPS2プライマーをそれぞれ100pmole加え、Taqポリメラーゼ(宝酒造株式会社)2.5U(0.5  $\mu$ l)とPCRバッファー液(250mM Tris-HCl (25℃でpH8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)20  $\mu$ l, 100mM DTT 1.0  $\mu$ l, 10mM dNTP 0.5  $\mu$ l(10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 酢酸BSA(4mg/ml)0.25  $\mu$ lを加え、最終容量が100  $\mu$ lになるように滅菌水を加えた。これらの混合溶液にミネラルオイル(Sigma Chemical社)を一滴添加し次の条件でPCRを行った。すなわち、95℃4分間の加熱処理後、95℃1分間、55℃1分間および72℃2分間の3ステップを30回繰り返してから、72℃10分間の処理をして反応を終了した。このPCR反応溶液から水相を取り出しその内の10  $\mu$ lに10×H溶液2  $\mu$ lを加え、次いで制限酵素SacII 20U(1  $\mu$ l)およびPstI 20U(1  $\mu$ l)を加え、滅菌水を7  $\mu$ l加えた後に37℃で1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約0.35kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を1.5mlチューブに入れ遠心分離機で15,000rpmで10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。

【0057】プラスミドpCV3をSacIIおよびPstIで処理した後の溶液に対して、上記のDNA溶5  $\mu$ lを加え、次いでDNAライゲーションキットVer. 2のI液2.0  $\mu$ lを加え、16℃で30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE (STRATAGENE社)0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で60秒間熱ショックを加えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地を0.9ml加え、37℃で1時間シェーカーで振とう培養した。5,000rpmで1分間遠心分離し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱

したコンピテントセルを懸濁して1:10の割合で2枚の100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むアンピシリプレートにまいた。37℃で一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち新たにSV40プロモーターDNAが挿入されているものを選び出しpSV0aとした。さらにこのプラスミドについて制限酵素SphIでセルフライゲーション(self-ligation)を行いエンハンサー部分を除去することにより、5' 末端にSacII-EcoRIサイトがついたP<sub>SV40DE</sub>を有するプラスミドpSVP1aを作製した。

10 【0058】(b) 弱化SV40プロモーター(NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロン用)の作製

配列番号5に示す塩基配列を有する5' センスプライマー(PS1)の代わりに、配列番号7に示す塩基配列を有する別の5' センスプライマー(PS3)を合成して用いた点を除き、上記(a)項に記載の弱化SV40プロモーター(DHFR遺伝子シストロン用)の作製と同様の方法で、NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロン用の弱化SV40プロモーターP<sub>SV40DE</sub>を有するプラスミドpSVP1bを作製した。このPS3プライマーは、5' 末端にSacIIサイトのみをつけたものである(EcoRIサイトは付けない)。3' アンチセンスプライマーは同じもの(PS2: 配列番号6)を使用した。

【0059】(4) SV40 polyAの調製

プラスミドpSV40pA-AのSV40 polyAシグナル配列の3' 末端EcoRIサイトにSPSV40リンカーをライゲートすることによりEcoRIサイトをつぶし、ApaI-ClaIサイトに変更した。まずSPSV40リンカーとして、配列番号8に示す塩基配列を有するセンスDNAと配列番号9に示す塩基配列を有するアンチセンスDNAを合成した。プラスミドpSV40pA-A 1ng(0.1  $\mu$ l)を制限酵素EcoRIでダイジェストした後、得られた溶液に対してSPSV40リンカーのセンスDNAとアンチセンスDNAをそれぞれ100pmole加え、次いでDNAライゲーションキットVer. 2のI液2.0  $\mu$ lを加え、16℃で30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE 0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で60秒間熱ショックを加えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地を0.9ml加え、37℃で1時間シェーカーで振盪培養した。5,000rpmで1分間遠心分離し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱したコンピテントセルを懸濁して1:10の割合で2枚の100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むアンピシリプレートにまいた。37℃で一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち新たにSPSV40リンカーのDNAが挿入されているものを選びpSV40pA-Bとした。

40 【0060】(5) 弱化SV40プロモーターとSV40 polyAを組み込んだカセットの作製

(a) DHFR遺伝子シストロン構築用プラスミドpSVP(D)S-1の作製

プラスミドpSV40pA-B 1ng(0.1  $\mu$ l)に制限酵素BamHI 20U(1  $\mu$ l)およびClaI 20U(1  $\mu$ l)を加え、滅菌水を7  $\mu$ l加えた後に37℃で1時間反応させた。反応液は、0.8%アガ

ローズゲルを用いて50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約0.8kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を1.5mlチューブに入れ遠心分離機で15,000rpmで10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。一方、プラスミドpSV1aを制限酵素BamHIおよびClaIで処理した後、得られた溶液1ng/0.1μlに対して上記のDNA溶液を0.5μl加え、DNAライゲーションキットVer. 2のI液2.0μlを加え、16℃で30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE 0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で60秒間熱ショックを加えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地を0.9ml加え、37℃で1時間シェーカーで振とう培養した。5,000rpmで1分間遠心分離し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁して1:10の割合で2枚の100μg/mlのアンピシリンを含むアンピシリンプレートにまいた。37℃で一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち新たにSV40 poly AのDNAが挿入されているものを選びpSVP(D)S-1とした。

#### 【0061】(b) NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロン構築用プラスミドpSVP(D)S-2の作製

上記(a)項に記載のpSVP(D)S-1作製と同様の方法で、pSV40pA-Bから得られたSV40 polyAのDNAとプラスミドpSVP1bをもとに、NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロン用の弱化SV40プロモーターとSV40 polyAをもつプラスミドpSVP(D)S-2を作製した。

#### 【0062】(6) DHFR遺伝子シストロンをもつカセットベクターの作製

##### (6-1) DHFR遺伝子のクローニング

##### (a) DHFR mRNAの単離

マウス繊維芽細胞株3T3を培養し10<sup>7</sup>cellsを得た後、グアニジンイソチオシアネート法(Meth. Enzymol., 152, 219頁, 1987年)によりmRNAを分離した。まずフラスコ中に細胞を浮遊させ、得られた細胞を滅菌処理したPBS中に再度浮遊させ遠心分離用チューブに移した。温度条件0℃下で450×G, 10分間の遠心分離を行い、上清は廃棄した。6MのGTG-CsCl, 10mMクエン酸ナトリウム, 0.1ml β-メルカプトエタノールおよび0.5%サルコシルの混合溶液に得られた細胞を加えて懸濁・溶解し、これを18ゲージの注射針を通してRNAを断片化した。このようにして得たもの2.5mlを、超遠心管中の5.7M CsCl, 0.1M EDTA液2.5mlの上に重層した。これを超遠心機を用いて35,000rpmで8時間遠心し、上清を注意深く捨てた後に、底に沈殿したRNA分画をフェノールで抽出し飽和させた滅菌水に溶解した。これにエタノールを加えて、12,000rpmの遠心でRNAを沈殿させた。ついで沈澱物をエタノールで3回洗浄したのち風乾した。得られたRNAを3mlのRNaseフリーの水に再懸濁した。こうして得られたmRNA試料の濃度は、260nmの吸光度により、約0.3μg/μlであった。

##### 【0063】(b) DHFR cDNAの調製

DHFRの遺伝子をPCR増幅するために、配列番号10に示す塩基配列を有する5'センスプライマー(PD1)と配列番号11に示す塩基配列を有する3'アンチセンスプライマー(PD2)を合成した。5'側末端はPstIサイトとナンセンスなピリミジン配列"TCCTC"を人為的に結合された配列とし、3'側末端は終止コドンから約85b下流にあるBglIIサイトまでを含むものとした。cDNAを合成するために、2μgの全RNAを含む10μlの溶液を用いた。滅菌したRNaseフリーのチューブに、PCRバッファー(250mM Tris-HCl(25℃でpH8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)20μl, 100mM DTT 1.0μl, 10mM dNTP 0.5μl(10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)、酢酸BSA(4mg/ml)0.25μl、オリゴdTプライマー2.0μg、PCR逆転写酵素(200 units/μl)0.5μlに0.5μlのRNaseフリーのDEPC水を加えた。これらを37℃で60分間インキュベートした後、70℃で15分間加熱し反応を停止させた。得られたcDNAは、用意したPCR用の反応液に直接加えた。この溶液にPD1プライマーとPD2プライマーをそれぞれ100pmole加え、次いでTaqポリメラーゼ(宝酒造株式会社)2.5U(0.5μl)とPCRバッファー液(250mM Tris-HCl(25℃でpH8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)20μl, 100mM DTT 1.0μl, 10mM dNTP 0.5μl(10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)、酢酸BSA(4mg/ml)0.25μlを加え、最終容量が100μlになるように滅菌水を加えた。これらの混合溶液にミネラルオイル(Sigma Chemical社)を一滴添加し次の条件でPCRを行った。すなわち、95℃4分間の加熱処理後、95℃1分間、55℃1分間および72℃2分間の3ステップを30回繰り返してから、72℃10分間の処理をして反応を終了した。このPCR反応溶液から水相を取り出しその内の10μlに10×H溶液2μlを加え、次いで制限酵素PstI 20U(1μl)およびBglII 20U(1μl)を加え、滅菌水を7μl加えた後に37℃で1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約0.65kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を1.5mlチューブに入れ遠心分離機で15,000rpmで10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。

##### 【0064】(6-2) DHFR遺伝子シストロンをもつカセットベクターpSVP(D)S/DHFRの構築

プラスミドpSVP(D)S-1を制限酵素PstIおよびBamHIでパーシャルダイジェスチョン処理した(これはSV40 polyA中にもPstIサイトが1ヶ所ふくまれていることによる)。この溶液0.1μl(1ng DNA)に対してDHFRのDNA溶液0.5μlを加え、5'末端はPstIで、また3'末端はBamHIとBglIIの突出末端で結合させた。このときDNAライゲーションキットVer. 2のI液2.0μlを加え、16℃で30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE 0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で60秒間熱ショックを加えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地を0.9ml加え、37℃で1時間シェーカーで振盪培養した。5,000rpm

mで1分間遠心し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱したコンピテントセルを懸濁して1:10の割合で2枚の100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むアンピシリプレートにまいた。37℃で一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち新たにDHFRのDNAが挿入されており、プラスミドがApaIの制限酵素サイトをもちものを選んだ。なおこのプラスミドからDHFR遺伝子を切り出しシーケンシングすることにより、DHFR遺伝子全配列および開始コドン“ATG”から(+4)の位置の塩基が“A”から“C”に変わっていることを確認した(Mu-DHFR、配列番号25)。

【0065】(7)NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロンをもつカセットベクターの作製

(a)トランスポゾン配列を含むNEO<sup>r</sup>遺伝子の調製

NEO<sup>r</sup>遺伝子領域には、354塩基からなる5'上流のトランスポゾン配列とNEO<sup>r</sup>遺伝子翻訳領域が繋がったものを使用した。この配列はTn5由来でpSV2-neoにふくまれているため切り出して使用した。まず、配列番号12に示す塩基配列を有する5'センスプライマー(PN1)と配列番号13に示す塩基配列を有する3'アンチセンスプライマー(PN2)を合成した。PN1プライマーの5'側末端には、元の配列のHindIIIサイトを變更してPstIサイトを付与した。また、PN2プライマーの3'側末端には、元のSmaIサイトを變更してBamHIサイトを付与した。pSV2-neoゲノム1ng(0.1  $\mu$ l)に対して、これらのPN1プライマーとPN2プライマーをそれぞれ100pmoleに加え、次いでTaqポリメラーゼ2.5U(0.5  $\mu$ l)とPCRバッファー液(250mM Tris-HCl(25℃でpH8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)20  $\mu$ l, 100mM DTT 1.0  $\mu$ l, 10mM dNTP 0.5  $\mu$ l(10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 酢酸BSA(4mg/ml)0.25  $\mu$ lを加え、最終容量が100  $\mu$ lになるように滅菌水を加えた。これらの混合溶液にミネラルオイルを一滴添加し次の条件でPCRを行った。すなわち、95℃4分間の加熱処理後、95℃1分間、55℃1分間および72℃2分間の3ステップを30回繰り返してから、72℃10分間の処理をして反応を終了した。このPCR反応溶液から水相を取り出しそのうちの10  $\mu$ lに10×H溶液2  $\mu$ lを加え、次いで制限酵素PstI 20U(1  $\mu$ l)およびBamHI 20U(1  $\mu$ l)を加え、滅菌水を7  $\mu$ l加えた後に37℃で1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約1.3kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を1.5mlチューブに入れ遠心分離機で15,000rpmで10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。

【0066】(b)NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロンをもつカセットベクターpSVP(D)S/NEOの構築

プラスミドpSVP(D)S-2をPstIおよびBamHIでパーシャルダイジェスチョン処理した(これはSV40 polyA中にもPstIサイトが1ヶ所ふくまれていることによる)。この溶液0.1  $\mu$ l(1ng DNA)に対してNEO<sup>r</sup>遺伝子のDNA溶液0.5  $\mu$ l

を加え、PstI-BamHIサイトにライゲートした。この反応には、DNAライゲーションキットVer. 2のI液2.0  $\mu$ lを加え、16℃で30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE 0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で60秒間熱ショックを加えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地を0.9mlに加え、37℃で1時間シェーカーで振盪培養した。5,000rpmで1分間遠心分離し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱したコンピテントセルを懸濁して1:10の割合で2枚の100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むアンピシリプレートにまいた。37℃で一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち新たにNEO<sup>r</sup>遺伝子を含むトランスポゾン配列DNAを挿入されているものをG418耐性で確認して選んだ。

【0067】(c)NEO<sup>r</sup>遺伝子への部分特異的突然変異導入

NEO<sup>r</sup>遺伝子翻訳領域開始コドン“ATG”の直後の塩基“A”を“C”に変更するため、配列番号24に示す塩基配列を有する変異導入用アンチセンスプライマーを合成した。pSVP(D)/NEOゲノム1ng(1  $\mu$ l)に対して、このアンチセンスプライマーを100pmoleに加え、PCR in vitro Mutagenesis Kit(宝酒造株式会社)を使用して部位特異的突然変異(site-directed mutagenesis)を誘導した。Taqポリメラーゼ2.5U(0.5  $\mu$ l)とPCRバッファー液(250mM Tris-HCl(25℃でpH8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)20  $\mu$ l, 100mM DTT 1.0  $\mu$ l, 10mM dNTP 0.5  $\mu$ l(10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 酢酸BSA(4mg/ml)0.25  $\mu$ lを加え、最終容量が100  $\mu$ lになるように滅菌水を加えた。これらの混合溶液にミネラルオイルを一滴添加し次の条件でPCRを行った。すなわち、95℃4分間の加熱処理後、95℃1分間、55℃1分間および72℃2分間の3ステップを30回繰り返してから、72℃10分間の処理をして反応を終了した。作製されたプラスミドベクターをpSVP(D)S/NEOとした。トランスポゾン配列から、NEO<sup>r</sup>遺伝子からなる配列を切り出し、改めてシーケンシングすることにより、これら全体の塩基配列と、NEO<sup>r</sup>遺伝子開始コドン“ATG”の直後の(+4)の位置の塩基が“A”から“C”に変わっていることを確認した(Mu-NEO<sup>r</sup>遺伝子)。この配列を配列番号26に示す。

【0068】(8)MCSシストロンをもつカセットベクターの作製

A. MCS関連遺伝子クローニング用プラスミドpCV4の作製

pUC18のマルチクローニングサイトを除去して新たにMCS関連遺伝子を組み入れるマルチクローニングサイト用のリンカー(CV4リンカー)として、配列番号14に示す塩基配列を有するセンスDNAと配列番号15に示す塩基配列を有するアンチセンスDNAを合成した。このリンカーの制限酵素切断配列は、3'-HindIII-EcoRV-ClaI-NotI-KpnI-XbaI-BglII-SplI-EcoRI-5'とした。プラスミドpUC18 1ng(0.1  $\mu$ l)を制限酵素HindIIIおよびEco

RIで処理した後、得られたプラスミドを含む溶液に対して、CV4リンカーのセンスDNAとアンチセンスDNAをそれぞれ100pmole加え、次いでDNAライゲーションキットVer. 2のI液2.0μlを加え、16℃で30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で60秒間熱ショックを加えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地を0.9ml加え、37℃で1時間シェーカーで振盪培養した。5,000rpmで1分間遠心分離し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱したコンピテントセルを懸濁して1:10の割合で2枚の100μg/mlのアンピシリンを含むアンピシリンプレートにまいた。37℃で一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち新たにCV4リンカーのDNAが挿入されているものを選び出しpCV4とした。

#### 【0069】B. P<sub>av</sub>の調製と組み込み

##### (a) P<sub>av</sub>の調製

プラスミドpSV2-neo/EcoHからP<sub>av</sub>を切り出すため、配列番号16に示す塩基配列を有する5' センスプライマー(PC1)と配列番号17に示す塩基配列を有する3' アンチセンスプライマー(PC2)を合成した。PC1プライマーの5' 側末端にはEcoRVサイトをまたPS2プライマーの3' 側末端にはClaIサイトを付与した。プラスミドpSV2-neo/EcoHゲノム1ng(0.1μl)に対して、これらのPC1プライマーとPC2プライマーをそれぞれ100pmole加え、次いでTaqポリメラーゼ2.5U(0.5μl)とPCRバッファー液(250mM Tris-HCl(25℃でpH8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)20μl, 100mM DTT1.0μl, 10mM dNTP 0.5μl(10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)、酢酸BSA(4mg/ml)0.25μlを加え、最終容量が100μlになるように滅菌水を加えた。これらの混合溶液にミネラルオイルを一滴添加し次の条件でPCRを行った。すなわち、95℃4分間の加熱処理後、95℃1分間、55℃1分間および72℃2分間の3ステップを30回繰り返してから、72℃10分間の処理をして反応を終了した。このPCR反応溶液から水相を取り出しうちの10μlに10×H溶液2μlを加え、次いで制限酵素EcoRV 20U(1μl)およびClaI 20U(1μl)を加え、滅菌水を7μl加えた後に37℃で1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約0.6kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を1.5mlチューブに入れ遠心分離機で15,000rpmで10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。

##### 【0070】(b) P<sub>av</sub>のMCSシストロン関連遺伝子クローニング用プラスミドへの組み込み

一方、組み込まれる側のプラスミドpCV4 1ng(1μl)を制限酵素EcoRVおよびClaIで処理した後、得られたプラスミドを含む溶液に対して、P<sub>av</sub> DNA溶液0.5μlを加え、EcoRV-ClaIサイトにライゲートした。この反応には、DNAライゲーションキットVer. 2のI液2.0μlを加え、16℃で30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセ

ルXL1-BLUE 0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で60秒間熱ショックを加えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地を0.9ml加え、37℃で1時間シェーカーで振盪培養した。5,000rpmで1分間遠心分離し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱したコンピテントセルを懸濁して1:10の割合で2枚の100μg/mlのアンピシリンを含むアンピシリンプレートにまいた。37℃で一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうちP<sub>av</sub>のDNAが挿入されているものを選び出しpCV4/CMVとした。

#### 【0071】C. bGH polyAの調製と組み込み

##### (a) bGH polyAを含むDNAの単離

採取したウシ肝臓細胞組織をドライアイス上でスライスしながら、100μg/mlになるようにプロティネースK溶液を加えたバッファー(150mM NaCl, 10mM Tris-HCl(pH 8.0), 10mM DETA, 0.1% SDS)で抽出し穏やかに混合した。55℃で1時間インキュベートした後、さらに37℃で一晩インキュベートした。Trisで平衡化した中性フェノールを等量加え、室温で20分間穏やかに混合した。室温で2,000×G、10分間の遠心分離を行い、得られた上層(5ml)を回収し新しいチューブに移した後、再度同じ条件で遠心分離を行った。再度上層を回収し新しいチューブに移した後、2倍量の100%エタノールを重層し、ゆっくりとかきまぜながらバッファーとエタノールを混合した。得られたDNAをガラス棒で巻き取って回収した後風乾し、5mlのTE溶液に入れ4℃で一晩おき溶解した。得られたDNA試料の濃度は、260nmの吸光度により約0.5μg/μlであった。

##### 【0072】(b) bGH polyA遺伝子のMCSシストロン関連遺伝子クローニング用プラスミドへの組み込み(1)

bGH polyA配列を二重に接続するために、制限酵素サイトの異なる二種類のbGHpolyA配列を作製した。このためあらかじめ、2組の5' センスプライマーと3' アンチセンスプライマー、すなわち、第一の組み合わせの配列番号18に示す塩基配列を有する5' センスプライマー(PB11)と配列番号19に示す塩基配列を有する3' アンチセンスプライマー(PB12)、および、第二の組み合わせの配列番号20に示す塩基配列を有する5' センスプライマー(PB21)と配列番号21に示す塩基配列を有する3' アンチセンスプライマー(PB22)を合成した。

【0073】得られたDNA試料のうち100ngを取り出し、PCRテンプレートを用いて所望の制限酵素切断配列を両端にもつbGH polyA配列を作製した。まずDNA試料100ng(1μl)に対して、第一の組み合わせのセンスプライマーPB11とアンチセンスプライマーPB12をそれぞれ100pmole加え、Taqポリメラーゼ2.5U(0.5μl)とPCRバッファー液(250mM Tris-HCl(25℃でpH8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)20μl, 100mM DTT 1.0μl, 10mM dNTP 0.5μl(10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)、酢酸BSA(4mg/ml)0.25μlを加え、最終容量が100μlになるように滅菌水を加えた。

これらの混合溶液にミネラルオイルを一滴添加し次の条件でPCRを行った。すなわち、95℃4分間の加熱処理後、95℃1分間、55℃1分間および72℃2分間の3ステップを30回繰り返してから、72℃10分間の処理をして反応を終了した。このPCR反応溶液から水相を取り出しそのうちの10  $\mu$  lに10×H溶液2  $\mu$  lを加え、次いで制限酵素XbaI 20U(1  $\mu$  l)およびBglII 20U(1  $\mu$  l)を加え、滅菌水を7  $\mu$  l加えた後に37℃で1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約0.23kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を1.5mlチューブに入れ遠心分離機で15,000rpmで10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。

【0074】プラスミドpCV4をXbaIおよびBglIIで処理した後の溶液0.1  $\mu$  l(1ng DNA)に対して、上記のDNA溶液0.5  $\mu$  lを加え、ついでDNAライゲーションキットVer. 2のI液2.0  $\mu$  lを加え、16℃で30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で60秒間熱ショックを加えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地を0.9ml加え、37℃で1時間シェーカーで振盪培養した。5,000rpmで1分間遠心分離し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱したコンピテントセルを懸濁して1:10の割合で2枚の100  $\mu$  g/mlのアンプシリンを含むアンプシリンプレートにまいた。37℃で一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち新たにbGH polyA DNAが挿入されているものを選びpCV4/CMV-bGH1とした。

【0075】(C) bGH polyA遺伝子のMCSシストロン関連遺伝子クローニング用プラスミドへの組み込み(2) 続いて、第一のプライマーの組み合わせでPCR増幅して得られたDNA試料のうち1ng(1  $\mu$  l)を取り出し、第二の組み合わせのセンスプライマーPB21とアンチセンスプライマーPB22をそれぞれ100pmole加え、次いでTaqポリメラーゼ2.5U(0.5  $\mu$  l)とPCRバッファー液(250mM Tris-HCl(25℃でpH8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>) 20  $\mu$  l, 100mM DTT 1.0  $\mu$  l, 10mM dNTP 0.5  $\mu$  l(10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 酢酸BSA(4mg/ml) 0.25  $\mu$  lを加え、最終容量が100  $\mu$  lになるように滅菌水を加えた。これらの混合溶液にミネラルオイルを一滴添加し次の条件でPCRを行った。すなわち、95℃4分間の加熱処理後、95℃1分間、55℃1分間および72℃2分間の3ステップを30回繰り返してから、72℃10分間の処理をして反応を終了した。このPCR反応溶液から水相を取り出しその内の10  $\mu$  lに10×H溶液2  $\mu$  lを加え、次いで制限酵素XbaI 20U(1  $\mu$  l)およびBglII 20U(1  $\mu$  l)を加え、滅菌水を7  $\mu$  l加えた後に37℃で1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約0.47kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を1.5mlチューブに入れ遠心分

離機で15,000rpmで10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。

【0076】プラスミドpCV4/CMV-bGH1をBamHIおよびSpIで処理した後の溶液0.1  $\mu$  l(1ng DNA)に対して、上記のDNA溶液0.5  $\mu$  lを加え、ついでDNAライゲーションキットVer. 2のI液2.0  $\mu$  lを加え、16℃で30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で60秒間熱ショックを加えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地を0.9ml加え、37℃で1時間シェーカーで振盪培養した。5,000rpmで1分間遠心分離し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱したコンピテントセルを懸濁して1:10の割合で2枚の100  $\mu$  g/mlのアンプシリンを含むアンプシリンプレートにまいた。37℃で一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち新たに第二のbGH polyA DNAが挿入されているもの、すなわちbGH polyAが二重に結合して挿入されているもの((bGH polyA)<sup>2</sup>)を選び、これをMCSシストロンをもつカセットベクターpEXP-BL2とした。作製されたpEXP-BL2をXbaIとSpIで切り出し、改めてシーケンシングし配列を確認した(配列番号27)。

【0077】(9)発現ベクターpNOW/CMV-Aの構築 (a) DHFRシストロンを構成するDNA配列の組み込み(プラスミドpNOW-1の作製)

プラスミドpSV(D)S/DHFR 100ng(1  $\mu$  l)に10×H溶液1  $\mu$  lを加え、制限酵素EcoRI 20U(1  $\mu$  l)を加え、37℃で1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付し、ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約1.75kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を1.5mlチューブに入れ遠心分離機で15,000rpmで10分間遠心を行い、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。このDNA配列はDHFR遺伝子シストロンを構成するもので、P<sub>SV40DE</sub>、Mu-DHFR遺伝子およびSV40 polyAからなる。

【0078】一方、DHFR遺伝子シストロンを構成するDNA配列が組み込まれる側のプラスミドpBBV 1ng(1  $\mu$  l)を制限酵素EcoRVおよびApaIで処理した。得られたプラスミドを含む溶液に対して、DHFR遺伝子シストロンを構成する配列のDNA溶液0.5  $\mu$  lを加え、EcoRV-ApaIサイト間にライゲートした。この反応には、DNAライゲーションキットVer. 2のI液2.0  $\mu$  lを加え、16℃で30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で60秒間熱ショックを加えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地を0.9ml加え、37℃で1時間シェーカーで振盪培養した。5,000rpmで1分間遠心分離し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱したコンピテントセルを懸濁して1:10の割合で2枚の100  $\mu$  g/mlのアンプシリンを含むアンプシリンプレートにまいた。37℃で一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうちDHFR遺伝子シストロンを構成するDNA配列が挿入されているものを選び出し

NOW-1とした。

【0079】(b) NEO<sup>+</sup>遺伝子シストロンを構成するDNA配列の組み込み(プラスミドpNOW-2の作製)

プラスミドpSVP(D)/S/NEO 100ng(1 $\mu$ l)に10 $\times$ H溶液1 $\mu$ lを加え、制限酵素SacI20U(1 $\mu$ l)およびClaI 20U(1 $\mu$ l)を加え、1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付し、ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約2.4kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を1.5mlチューブに入れ遠心分離機で15,000rpmで10分間遠心を行い、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。この配列はNEO<sup>+</sup>シストロンを構成するDNA配列で、P<sub>SV40DE</sub>、トランスポゾン配列、Mu-NEO<sup>+</sup>遺伝子およびSV40 polyAからなる。

【0080】一方、NEO<sup>+</sup>遺伝子シストロンを構成するDNA配列が組み込まれる側のプラスミドpNOW-1 1ng(1 $\mu$ l)を制限酵素SacIIおよびClaIで処理した。得られたプラスミドを含む溶液1ng(0.1 $\mu$ l)に対して、NEO<sup>+</sup>遺伝子シストロンを構成する配列のDNA溶液0.5 $\mu$ lを加え、SacI-ClaIサイト間にライゲートした。この反応には、DNAライゲーションキットVer. 2のI液2.0 $\mu$ lを加え、16 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42 $^{\circ}$ Cで60秒間熱ショックを加えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地を0.9ml加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間シェーカーで振盪培養した。5,000rpmで1分間遠心分離し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱したコンピテントセルを懸濁して1:10の割合で2枚の100 $\mu$ g/mlのアンプシリンを含むアンプシリンプレートにまいた。37 $^{\circ}$ Cで一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうちNEO<sup>+</sup>遺伝子シストロンを構成するDNA配列が挿入されているものを選んだ(pNOW-2P)。

【0081】得られたプラスミドpNOW-2PのマルチクローニングサイトのClaIサイトを除去するため、ApaI-ClaI-EcoRV部分を新たに合成したApaI-EcoRVリンカーで置換することによりClaIサイトを除去した。まずこのリンカーとして、5'-CGAT-3'の塩基配列を有するセンスDNAと3'-CGGGCTA-5'の塩基配列を有するアンチセンスDNAを合成した。プラスミドpNOW-2P 1ng(0.1 $\mu$ l)を制限酵素ApaIおよびEcoRVでダイジェストした後、得られた溶液に対して、ApaI-EcoRVリンカーセンスDNAとアンチセンスDNAをそれぞれ100pmole加え、次いでDNAライゲーションキットVer. 2のI液2.0 $\mu$ lを加え、16 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42 $^{\circ}$ Cで60秒間熱ショックを加えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地を0.9ml加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間シェーカーで振盪培養した。5,000rpmで1分間遠心分離し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱したコンピテントセルを懸濁して1:10の割合で2枚の100 $\mu$ g/mlのアンプシリンを含むアンプシ

リンプレートにまいた。37 $^{\circ}$ Cで一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち新たにClaIでダイジェストできないものを選び出しpNOW-2とした。

【0082】(c) MCSシストロンを構成するDNA配列の組み込み(プラスミドpNOW/CMV-Aの作製)

プラスミドpEXP-BL2 100ng(1 $\mu$ l)に10 $\times$ H溶液1 $\mu$ lを加え、制限酵素EcoRV 20U(1 $\mu$ l)およびSplI 20U(1 $\mu$ l)を加え、1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約1.1kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を1.5mlチューブに入れ、遠心分離機で15,000rpmで10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。この配列はMCSシストロンを構成するDNA配列で、P<sub>CMV</sub>、MCS-B、および(bGH polyA)<sup>2</sup>からなる。

【0083】一方、MCSシストロンを構成するDNA配列が組み込まれる側のプラスミドpNOW-21ng(0.1 $\mu$ l)を制限酵素EcoRVおよびSplIで処理した。得られたプラスミドを含む溶液1ng(0.1 $\mu$ l)に対して、MCSシストロンを構成する配列のDNA溶液0.5 $\mu$ lを加え、EcoRV-SplIサイトにライゲートした。この反応には、DNAライゲーションキットVer. 2のI液2.0 $\mu$ lを加え、16 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42 $^{\circ}$ Cで60秒間熱ショックを加えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地を0.9ml加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間シェーカーで振盪培養した。5,000rpmで1分間遠心分離し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱したコンピテントセルを懸濁して1:10の割合で2枚の100 $\mu$ g/mlのアンプシリンを含むアンプシリンプレートにまいた。37 $^{\circ}$ Cで一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうちMCSシストロンを構成するDNA配列が挿入されているものを選んだ。こうして作製された発現ベクターをpNOW/CMV-Aとした。この発現ベクターpNOW/CMV-Aについて、構成する各部分を制限酵素により断片化し、それぞれをシーケンシングしつなぎあわせることにより、各遺伝子配列が正しく挿入されていることを確認した。

【0084】

【実施例2】

(1)合成リンカー挿入配列をもつ発現ベクターpNOW/CMV-AAの構築

(a) 合成リンカーの作製

トリプレットの構成単位として開始位置の異なる3種類のアミノ酸配列をコードし得る配列をすべて含むことよりなる遺伝子配列を調製するために、第一配列として、配列番号30に示す塩基配列を有するリンカー(MSR-linker 1(+))と配列番号31に示すその相補配列(MSR-linker 1(-))を合成した。次に、第二配列として配列番号33に示す塩基配列を有するリンカー(MSR-linker 2(-))と配列番号32に示すその相補配列(MSR-linker 2(+))

を合成した。MSR-linker 1(+)の5'末端にはPstIサイト、3'末端にはMSR-linker 2とアニーリングして接続するための配列"CCAAGC"が付与されている。また、MSR-linker 2(-)の3'末端にはEcoRVサイト、5'末端には第一配列とアニーリングして接続するための配列"GGTTCG"が付与されている。

#### 【0085】(b) 2つのリンカーの接続

PCRテンプレートをを用いて所望の制限酵素切断配列を両端にもつMSRリンカー配列を作製した。第一の組み合わせのセンスMSR-linker 1(+)とアンチセンスMSR-linker 1(-)をそれぞれ100pmoleを用意し、Taqポリメラーゼ2.5 U(0.5  $\mu$ l)とPCRバッファー液(250mM Tris-HCl (25℃でpH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>) 20  $\mu$ l, 100mM DTT 1.0  $\mu$ l, 10mM dNTP 0.5  $\mu$ l (10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 酢酸BSA (4mg/ml) 0.25  $\mu$ lを加え、最終容量が100  $\mu$ lになるように滅菌水を加えた。これらの混合溶液にミネラルオイルを一滴添加し次の条件でPCRを行った。すなわち、95℃4分間の加熱処理後、95℃1分間、55℃1分間および72℃2分間の3ステップを30回繰り返してから、72℃10分間の処理をして反応を終了した。このPCR反応溶液から水相を取り出しその内の10  $\mu$ lに10×H溶液2  $\mu$ lを加え、次いで制限酵素PstI 20U(1  $\mu$ l)およびEcoRV 20U(1  $\mu$ l)を加え、滅菌水を7  $\mu$ l加えた後に37℃で1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約0.1kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を1.5mlチューブに入れ遠心分離機で15,000rpmで10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。

【0086】プラスミドpUC18をPstIおよびSmaIで処理した後の溶液0.1  $\mu$ l(1ng DNA)に対して、上記のDNA溶液0.5  $\mu$ lを加え、ついでDNAライゲーションキットVer.2のI液2.0  $\mu$ lを加え、16℃で30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で60秒間熱ショックを加えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地を0.9ml加え、37℃で1時間シェーカーで振盪培養した。5,000rpmで1分間遠心分離し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱したコンピテントセルを懸濁して1:10の割合で2枚の100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むアンピシリンプレートにまいた。37℃で一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち新たにMSRリンカーDNAが挿入されているものを選びpUC18/MSRとした。

【0087】(c) Mu-NEO<sup>r</sup>遺伝子翻訳領域の切り出し  
pSVP(D)S/NEOからMu-NEO<sup>r</sup>遺伝子翻訳領域を切り出すため、配列番号34に示す塩基配列を有する5'センスプライマー(NEO-N'1)と配列番号35に示す3'アンチセンスプライマー(NEO-N'2)を合成した。NEO-N'1プライマーの5'末端にはEcoRVサイトが、NEO-N'2の3'末端にはBamHIサイトを付与した。pNOW/CMV-Aゲノム 1ng(0.1  $\mu$ l))に

対して、これらのNEO-N'1プライマーとNEO-N'2プライマーをそれぞれ100pmole加え、Taqポリメラーゼ2.5U(0.5  $\mu$ l)とPCRバッファー液(250mM Tris-HCl (25℃でpH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>) 20  $\mu$ l, 100mM DTT 1.0  $\mu$ l, 10mM dNTP 0.5  $\mu$ l (10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 酢酸BSA (4mg/ml) 0.25  $\mu$ lを加え、最終容量が100  $\mu$ lになるように滅菌水を加えた。これらの混合溶液にミネラルオイルを一滴添加し次の条件でPCRを行った。すなわち、95℃4分間の加熱処理後、95℃1分間、55℃1分間および72℃2分間の3ステップを30回繰り返してから、72℃10分間の処理をして反応を終了した。このPCR反応溶液から水相を取り出しその内の10  $\mu$ lに10×H溶液2  $\mu$ lを加え、次いで制限酵素EcoRV 20U(1  $\mu$ l)およびBamHI 20U(1  $\mu$ l)を加え、滅菌水を7  $\mu$ l加えた後に37℃で1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約0.8kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を1.5mlチューブに入れ遠心分離機で15,000rpmで10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。

#### 【0088】(d) MSRリンカーとNEO<sup>r</sup>の接続

PCRテンプレートをを用いてMSRリンカー配列とMu-NEO<sup>r</sup>配列を接続した。上記(b)および(c)で調製された各配列のDNAをそれぞれ100pmoleを用意し、Taqポリメラーゼ2.5U(0.5  $\mu$ l)とPCRバッファー液(250mM Tris-HCl (25℃でpH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>) 20  $\mu$ l, 100mM DTT 1.0  $\mu$ l, 10mM dNTP 0.5  $\mu$ l (10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 酢酸BSA (4mg/ml) 0.25  $\mu$ lを加え、最終容量が100  $\mu$ lになるように滅菌水を加えた。これらの混合溶液にミネラルオイルを一滴添加し次の条件でPCRを行った。すなわち、95℃4分間の加熱処理後、95℃1分間、55℃1分間および72℃2分間の3ステップを30回繰り返してから、72℃10分間の処理をして反応を終了した。このPCR反応溶液から水相を取り出しその内の10  $\mu$ lに10×H溶液2  $\mu$ lを加え、次いで制限酵素PstI 20U(1  $\mu$ l)およびBamHI 20U(1  $\mu$ l)を加え、滅菌水を7  $\mu$ l加えた後に37℃で1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約0.9kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を1.5mlチューブに入れ遠心分離機で15,000rpmで10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。

#### 【0089】(e) NEO<sup>r</sup>遺伝子シストロンをもつカセットベクターpSVP(D)S/NEOへの組み込み

得られたDNA(MSRリンカーとNEO<sup>r</sup>の接続配列)を実施例1で得られたプラスミドpSVP(D)S/NEOへ組み込んだ。pSVP(D)S/NEOをPstIおよびBamHIでパーシャルダイジェスション処理した(これはSV40 polyA中にもPstIサイトが1ヶ所ふくまれていることによる)。この溶液0.1  $\mu$ l(1ng DN A)に対してNEO<sup>r</sup>遺伝子のDNA溶液0.5  $\mu$ lを加え、PstI-B

amHI サイト間にライゲートした。この反応には、DNA ライゲーションキット Ver. 2 の I 液  $2.0 \mu\text{l}$  を加え、 $16^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセル XL1-BLUE  $0.1\text{ml}$  に加え、氷上で 30 分間反応させた後、 $42^\circ\text{C}$  で 60 秒間熱ショックを加えた。2 分間氷上に置いた後、SOC 培地を  $0.9\text{ml}$  加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間シェーカーで振盪培養した。5,000rpm で 1 分間遠心分離し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱したコンピテントセルを懸濁して 1:10 の割合で 2 枚の  $100 \mu\text{g/ml}$  のアンピシリンを含むアンピシリンプレートにまいた。 $37^\circ\text{C}$  で一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち新たに MSR リンカー配列に接続された Mu-NEO<sup>r</sup> 遺伝子を含む DNA が挿入されているものを G418 耐性で確認して選んだ (pSVP(D)/S/NEO-A)。

【0090】(f) 発現ベクター pNOW/CMV-AA の構築  
以下、実施例 1 と同様の方法で、pSVP(D)/S/NEO-A から NEO<sup>r</sup> 遺伝子シストロンを構成する DNA 配列を切り出してプラスミド pNOW-1 に組み込むことにより pNOW-2PA を作製した。さらに実施例 1 と同様の方法で pNOW-2 に対応する pNOW-2A を作製し、続いてプラスミド pEXP-BL2 から切り出した MCS シストロンを構成する DNA 配列を pNOW-2A に組み込んだ。こうして作製された NEO<sup>r</sup> 遺伝子シストロンに合成リンカー挿入配列をもつ発現ベクターを pNOW/CMV-AA とした。この発現ベクターについて、構成する各部分を制限酵素により断片化し、それぞれをシーケンシングしつなぎあわせることにより、各遺伝子配列が正しく挿入されていることが確認した。

#### 【0091】

##### 【実施例 3】

(1) pNOW/CMV-AA を用いたコングルチニンの産生試験

(a) コングルチニン cDNA の調製と pNOW/CMV-AA への組み込み

プラスミドベクター pNOW/CMV-AA の MCS-B に遺伝子を組み込むために、ウシコングルチニン cDNA の両端の制限酵素切断配列を配列番号 2 に示す塩基配列を有する 5' センスプライマーと配列番号 3 に示す塩基配列を有する 3' アンチセンスプライマーを用いて改変した。pNOW/CMV-AA  $1\text{ng}/0.1 \mu\text{l}$  を制限酵素 XbaI および NotI で処理した後、得られたプラスミドを含む溶液  $1\text{ng}/0.1 \mu\text{l}$  に対して、コングルチニン cDNA 末端改変のためのセンスプライマーとアンチセンスプライマーをそれぞれ  $100\text{pmole}$  加え、DNA ライゲーションキット Ver. 2 の I 液  $2.0 \mu\text{l}$  を加えて  $16^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセル XL1-BLUE  $0.1\text{ml}$  に加え、氷上で 30 分間反応後、 $42^\circ\text{C}$  で 60 秒間熱ショックを加えた。2 分間氷上に置いた後 SOC 培地を \*

\*  $0.9\text{ml}$  加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間シェーカーで振盪培養した。5,000rpm で 1 分間遠心し上清を廃棄した。チューブ内に残った溶液で沈澱したコンピテントセルを懸濁して 1:10 の割合で 2 枚の  $100 \mu\text{g/ml}$  のアンピシリンを含むアンピシリンプレートにまいた。 $37^\circ\text{C}$  で一晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち新たにコングルチニンの DNA が挿入されているものを選んだ。組み込まれたコングルチニン遺伝子を切り出し改めてシーケンシングし塩基配列を確認した (配列番号 28)。

10 【0092】(b) 宿主 CHO 細胞 (DHFR 欠損株) への遺伝子導入

子牛胎児血清 (FCS, GIBCO 社) を 10% 添加した F12 培地 (GIBCO 社) を調製し、これに DHFR 遺伝子を欠損した CHO 細胞株を  $1 \times 10^5 \text{cells/ml}$  になるように混合し、直径 60mm のディッシュに植え、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の条件で 24 時間培養した。培養上清を廃棄し、その代わりにあらかじめリポフェクション溶液 (BRL 社) と混合した  $5 \mu\text{g}$  の DNA (コングルチニン遺伝子を組み込んだ pNOW/CMV-AA) を含む 10% FCS 添加 F12 培地  $5\text{ml}$  を加え 16 時間培養した。培養した細胞をトリプシン処理によりディッシュより回収し、細胞数を数えた後  $1 \times 10^5 \text{cells/ml}$  になるように  $400 \mu\text{g/ml}$  の濃度で G418 を含む 10% FCS 添加 F12 培地に細胞を懸濁し、これを  $0.1\text{ml}/\text{ウェル}$  になるように 96 ウェルのマイクロプレート 2 枚に播種した。 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の条件で 2 週間培養したところ 192 ウェル中 33 ウェルにおいてのみ生存細胞がみられ G418 耐性を獲得した細胞の増殖をみた。

#### 【0093】(2) コングルチニン産生試験

(a) G418 耐性細胞の増殖とコングルチニン産生レベル測定試験

30 コングルチニン産生レベルを確認したところ、殆どの G418 耐性株において高水準であったが、これらのうちから代表的な 5 クロニーを選んでクロニングを 2 回繰り返した。続いて、10% FCS 添加 F12 培地に G418 耐性細胞を混合し ( $2 \times 10^5 \text{cells/ml}$  濃度)、細胞クローン  $5\text{ml}$  をそれぞれ  $25\text{cm}^2$  のカルチャーフラスコに植えた。細胞がコンフルエントになるまで培養し細胞数を測定したところ  $2 \times 10^6 \text{cells}$  であった。それぞれのディッシュの培養上清を廃棄し、同じ組成の 10% FCS 添加 F12 培地を  $2\text{ml}$  加え、4 日間培養し、その培養上清を回収した。コングルチニンの産生量を測定したところ、全てのディッシュで  $14 \mu\text{g}/2\text{ml}$  を超えていることが判明した。産生量を表 1 に示す。最も産生レベルの高かったクローン 7-3 は  $11.8 \mu\text{g/ml}$  に達した。

#### 【0094】

##### 【表 1】

表1 G418耐性クローンのコングルチニン産生量

クローン名	6-1	7-3	8-3	9-3	10-3
産生量( $\mu\text{g/ml}$ )	7.0	11.8	7.2	7.8	8.8

【0095】

【実施例4】

(1) pNOW/CMV-Aを用いたコングルチニンの産生試験

(a) コングルチニンcDNAのpNOW/CMV-Aへの組み込みと宿主CHO細胞(DHFR欠損株)への遺伝子導入

実施例3と同様の方法で、ウシコングルチニン遺伝子をプラスミドベクターpNOW/CMV-AのMCS-Bに組み込んだ。子牛胎児血清(FCS, GIBCO社)を10%添加したF12培地(GIBCO社)を調製し、これにDHFR遺伝子を欠損したCHO細胞株を $1 \times 10^5$  cells/mlになるように混合し、直径60mmのディッシュに植え、37℃, 5%  $\text{CO}_2$ の条件で24時間培養した。培養上清を廃棄し、その代わりにあらかじめリポフェクション溶液(BRL社)と混合した5  $\mu\text{g}$ のDNA(コングルチニン遺伝子を組み込んだpNOW/CMV-A)を含む10%FCS添加F12培地5mlを加え16時間培養した。培養した細胞をトリプシン処理によりディッシュより回収し、細胞数を数えた後 $1 \times 10^5$  cells/mlになるように400  $\mu\text{g/ml}$ の濃度でG418を含む10%FCS添加F12培地に細胞を懸濁し、これを0.1ml/ウェルになるように96ウェルのマイクロプレート10枚に播種した。37℃, 5%  $\text{CO}_2$ の条件で2週間培養したところ960ウェル \* 10

\* ル中48ウェルにおいてのみ生存細胞がみられG418耐性を獲得した細胞の増殖をみた。

【0096】(2) コングルチニン産生試験

(a) G418耐性細胞の増殖とコングルチニン産生レベル測定試験

コングルチニン産生レベルを確認したところ、殆どのG418耐性株において高水準であったが、これらのうちから代表的な5ウェルを選んでクローニングを2回繰り返した。続いて、10%FCS添加F12培地にG418耐性細胞を混合し( $2 \times 10^5$  cells/ml濃度)、細胞クローン5mlをそれぞれ25cm<sup>2</sup>のカルチャーフラスコに植えた。細胞がコンフルエントになるまで培養し細胞数を測定したところ $2 \times 10^6$  cellsであった。それぞれのディッシュの培養上清を廃棄し、同じ組成の10%FCS添加F12培地を2ml加え、4日間培養し、その培養上清を回収した。コングルチニンの産生量を測定したところ、全てのディッシュで4  $\mu\text{g/2ml}$ を超えていることが判明した。産生量を表2に示す。最も産生レベルの高かったクローン11Aは6.8  $\mu\text{g/ml}$ に達した。

【0097】

【表2】

表2 G418耐性クローンのコングルチニン産生量

クローン名	5D	6H	11A	10C	9G
産生量( $\mu\text{g/ml}$ )	2.3	4.0	6.8	3.4	2.5

【0098】(b) MTXによるプラスミド遺伝子増幅  
コングルチニン産生クローンをさらに継代培養し安定化させた後、低濃度のMTXを培地に加え遺伝子増幅を行った。第一段階として、MTX 10nM, G418 200  $\mu\text{g/ml}$ を加えた10%FCS添加I-MEM培地(GIBCO社, ハイポキサンチンとチミジンが含まれていない)にセレクトした細胞クローン11Aを混合し、25cm<sup>2</sup>のカルチャーフラスコに植えコンフルエントになるまで培養した(2週間)。培養上清を廃棄し、同じ組成のFCS添加I-MEM培地(10nM MTX, 200  $\mu\text{l/ml}$  G418を加えたもの)を2ml加え4日間培養した後、培養上清を回収しコングルチニンの産生レベルを測定した。※ 40

※ 続いて、MTX 50nM, G418 200  $\mu\text{g/ml}$ を加えた10%FCS添加I-MEM培地で再度コンフルエントになるまで培養した(2週間)。培養上清を廃棄し、同じ組成のFCS添加I-MEM培地(50nM MTX, 200  $\mu\text{l/ml}$  G418を加えたもの)を2ml加え4日間培養し、培養上清を回収しコングルチニンの産生レベルを測定した。結果は表3の通りであった。得られた細胞は極めて増殖速度が遅く、アダプテーションが進んで増殖が早くなればさらに高いレベルの生産性に達すると思われた。

【0099】

【表3】

表3 MTX増幅後の細胞クローン11Aのコングルチニン産生量

MTX濃度	—	10nM	50nM
産生量( $\mu\text{g/ml}$ )	6.8	9.4	18.6

【0100】

【実施例5】

(1) ヒトIFN- $\beta$  産生試験

実施例4と同様の手順で、ヒトIFN- $\beta$  (Gene, 10, 11頁, 1980年)のcDNAを繊維芽細胞よりクローニングした後pNOW/CMV-Aに組み込み、さらにDHFR欠損CHO細胞株に遺伝子導入した。G418セクション後ヒトIFN- $\beta$ の産生レベルを\*

\* みたところ表4の通りであった。なお、IUは抗ウイルス活性により求めた値である。

【0101】

【表4】

表4 G418耐性クローンのIFN- $\beta$  産生量

クローン名	G	72	66	10	20
産生量(IU/ml)	149,000	130,000	98,800	55,800	31,800

## 【0102】 (2) MTXによるプラスミド遺伝子増幅

※ ころ表5の通りであった。

実施例4と同様の手順でヒトIFN- $\beta$  産生クローン72を低濃度のMTX培地に加え、遺伝子増幅を行った。まずMTX 50nMで増幅した後、ヒトIFN- $\beta$  産生レベルを測定したと ※

【0103】

【表5】

表5 MTX増幅後の細胞クローン72のヒトIFN- $\beta$  産生量

MTX濃度(nM)	0	50
産生量(IU/ml)	130,000	645,000

【0104】 (3) ヒトIFN- $\beta$  産生クローンの無血清培地への馴化

## ★試験

ヒトIFN- $\beta$  産生クローン72を50nM MTXで遺伝子増幅したクローン7222について無血清培地(CHO-S-SFM II, GIBCO社, ヒポキサンチンとチミジンが含まれていない)に200 $\mu$ g/ml G418, 50nM MTXを加えた培地で馴化した。

実施例5(1)で得たヒトIFN- $\beta$  cDNAを組み込んだpNOW/CMV-Aを、無血清培地(CHO-S-SFM II, GIBCO社, ヒポキサンチンとチミジンが含まれていない)で馴化したDHFR欠損CHO細胞株に遺伝子導入し、同培地に200 $\mu$ g/ml G418を加えた培地でセクション後、ヒトIFN- $\beta$ の産生量を測定したところ、表6の通りであった。

【0105】馴化後にヒトIFN- $\beta$  産生量を測定した結果、473,900IU/mlであり、10%FCS添加時とほぼ同等の結果を得た。

【0107】

30 【表6】

【0106】 (4) 無血清培地を用いたヒトIFN- $\beta$  産生★表6 無血清培地で培養したG418耐性クローンのヒトIFN- $\beta$  産生量

クローン名	SF10	SF14
産生量(IU/ml)	68,000	50,000

【発明の効果】本発明により、哺乳動物細胞を宿主として高水準の遺伝子組換えタンパク質生産を可能にする発現ベクターを提供することができる。

【0108】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 41

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

アンチセンス: NO

配列の特徴

特徴を表す記号: Cleavage-site

存在位置: 0<sup>^</sup>1

40 特徴を表す記号: Cleavage-site

存在位置: 8<sup>^</sup>9

特徴を表す記号: Cleavage-site

存在位置: 13<sup>^</sup>14

特徴を表す記号: Cleavage-site

存在位置: 20<sup>^</sup>21

特徴を表す記号: Cleavage-site

存在位置: 24<sup>^</sup>25

特徴を表す記号: Cleavage-site

存在位置: 30<sup>^</sup>31

50 特徴を表す記号: Cleavage-site

存在位置：40~41

## 配列

TATGCCGCGG AATCGATGAT TACCGTACGG AATTCGGGCC C

41

【0109】配列番号：2

\* 存在位置：4~5

配列の長さ：39

特徴を表す記号：Cleavage-site

配列の型：核酸

存在位置：13~14

鎖の数：一本鎖

特徴を表す記号：Cleavage-site

トポロジー：直鎖状

存在位置：18~19

配列の種類：他の核酸 合成DNA

特徴を表す記号：Cleavage-site

アンチセンス：YES

10 存在位置：26~27

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：32~33

存在位置：0~1

特徴を表す記号：Cleavage-site

特徴を表す記号：Cleavage-site

\* 存在位置：34~35

## 配列

ACGGCGCCTT AGCTACTAAT GGCATGCCTT AAGCCCGGG

39

【0110】配列番号：3

※ 存在位置：0~1

配列の長さ：29

特徴を表す記号：Cleavage-site

配列の型：核酸

存在位置：9~10

鎖の数：一本鎖

20 特徴を表す記号：Cleavage-site

トポロジー：直鎖状

存在位置：16~17

配列の種類：他の核酸 合成DNA

特徴を表す記号：Cleavage-site

アンチセンス：NO

存在位置：18~19

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

特徴を表す記号：Cleavage-site

※ 存在位置：25~26

## 配列

AGCTTCCGCG GCTGCAGGGA TCCATCGAT

29

【0111】配列番号：4

★ 存在位置：0~1

配列の長さ：29

特徴を表す記号：Cleavage-site

配列の型：核酸

30 存在位置：3~4

鎖の数：一本鎖

特徴を表す記号：Cleavage-site

トポロジー：直鎖状

存在位置：8~9

配列の種類：他の核酸 合成DNA

特徴を表す記号：Cleavage-site

アンチセンス：YES

存在位置：18~19

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

特徴を表す記号：Cleavage-site

★ 存在位置：23~24

## 配列

AGGCGCCGAC GTCCCTAGGT AGCTATTAA

29

【0112】配列番号：5

☆ アンチセンス：NO

配列の長さ：37

40 配列の特徴

配列の型：核酸

特徴を表す記号：Cleavage-site

鎖の数：一本鎖

存在位置：6~7

トポロジー：直鎖状

特徴を表す記号：Cleavage-site

配列の種類：他の核酸 合成DNA

☆ 存在位置：9~10

## 配列

CCCCGCGGGA ATTCTGTGGA ATGTGTGTCA GTTAGGG

37

【0113】配列番号：6

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：32

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

アンチセンス：YES

鎖の数：一本鎖

50 配列の特徴

特徴を表す記号: Cleavage-site

\* \* 存在位置: 7~8

配列

CCCTGCAGCT TTTTGCAAAA GCCTAGGCCT CC

32

【0114】配列番号: 7

※配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の長さ: 31

アンチセンス: NO

配列の型: 核酸

配列の特徴

鎖の数: 一本鎖

特徴を表す記号: Cleavage-site

トポロジー: 直鎖状

※ 存在位置: 6~7

配列

CCCCGCGGTG TGAATGTGT GTCAGTTAGG G

31

【0115】配列番号: 8

★アンチセンス: NO

配列の長さ: 16

配列の特徴

配列の型: 核酸

特徴を表す記号: Cleavage-site

鎖の数: 一本鎖

存在位置: 9~10

トポロジー: 直鎖状

特徴を表す記号: Cleavage-site

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

★ 存在位置: 12~13

配列

AATTGGGCC ATCGAT

16

【0116】配列番号: 9

☆アンチセンス: YES

配列の長さ: 16

20 配列の特徴

配列の型: 核酸

特徴を表す記号: Cleavage-site

鎖の数: 一本鎖

存在位置: 1~2

トポロジー: 直鎖状

特徴を表す記号: Cleavage-site

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

☆ 存在位置: 8~9

配列

CCCGGTAGC TATTAA

16

【0117】配列番号: 10

◆配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の長さ: 41

アンチセンス: NO

配列の型: 核酸

配列の特徴

鎖の数: 一本鎖

30 特徴を表す記号: Cleavage-site

トポロジー: 直鎖状

◆ 存在位置: 7~8

配列

GGCTGCAGTC CCTCATGCTT CGACCATGA ACTGCATCGT C

41

【0118】配列番号: 11

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の長さ: 32

アンチセンス: YES

配列の型: 核酸

配列の特徴

鎖の数: 一本鎖

特徴を表す記号: Cleavage-site

トポロジー: 直鎖状

存在位置: 3~4

配列

ATAGATCTAA AGCCAGCAAA AGTCCCATGG TC

32

【0119】配列番号: 12

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の長さ: 28

アンチセンス: NO

配列の型: 核酸

配列の特徴

鎖の数: 一本鎖

特徴を表す記号: Cleavage-site

トポロジー: 直鎖状

存在位置: 7~8

配列

GGCTGCAGCT TCACGCTGCC GCAAGCAC

28

【0120】配列番号: 13

鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 29

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

50 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

41

アンチセンス：YES

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

配列

GGGGATCCGG GGTGGGCGAA GAACTCCAG

【0121】配列番号：14

配列の長さ：50

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：NO

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：0<sup>1</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：8<sup>9</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

配列

AGCTTGATAT CATCGATGCG GCCGCGGTAC CAGATCTCGT ACGTCTAGAG

【0122】配列番号：15

配列の長さ：50

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：0<sup>1</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：4<sup>5</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

配列

ACTATAGTAG CTACGCCGGC GCCATGGTCT AGAGCATGCA GATCTCTTAA

【0123】配列番号：16

配列の長さ：47

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CCGATTACTT ACCGCCATGT TGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAA

【0124】配列番号：17

配列の長さ：45

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CCATCGATCG GTTCACTAAA CGAGCTCTGC TTATATAGAC CTCCC

【0125】配列番号：18

50 配列の長さ：30

42

\* 存在位置：1<sup>2</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

\* 存在位置：3<sup>4</sup>

29

※ 存在位置：13<sup>14</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：19<sup>20</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

10 存在位置：30<sup>31</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：32<sup>33</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：38<sup>39</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：44<sup>45</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

※ 存在位置：50<sup>51</sup>

50

★ 存在位置：11<sup>12</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：19<sup>20</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：22<sup>23</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：32<sup>33</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：38<sup>39</sup>

30 特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：44<sup>45</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

★ 存在位置：50<sup>51</sup>

50

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：NO

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

☆ 40 存在位置：5<sup>6</sup>

47

◆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

◆ 存在位置：4<sup>5</sup>

45

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTCTAGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT

【0126】配列番号：19

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CCAGATCTGTAC CCATAGAGCC CACCGCATCC

【0127】配列番号：20

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TTGGATCCCT GTGCCTTCTA GTGCCAGCC AT

【0128】配列番号：21

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TTCGTACGGA TCCCATAGAG CCCACCGCAT CC

【0129】配列番号：22

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AAGCGGCCGC TCTCAACTTG CTTTCTGTG

【0130】配列番号：23

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CCTCTAGAGC CAGTTTCAAA CTTTATTC

【0131】配列番号：24

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ATCTTGTTCA AGCATGCCAA ACGATCCT

【0132】配列番号：25

配列の長さ：651

配列の型：核酸

\* アンチセンス：NO

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

\* 存在位置：2<sup>3</sup>

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

配列の特徴

10 特徴を表す記号：Cleavage-site

※ 存在位置：3<sup>4</sup>

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：NO

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

★ 存在位置：3<sup>4</sup>

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

☆ 存在位置：3<sup>4</sup>

◆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：NO

30 配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

◆ 存在位置：4<sup>5</sup>

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：3<sup>4</sup>

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：cDNA

45

46

アンチセンス：NO

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：0`1

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：651`652

特徴を表す記号：CDS

\* 存在位置：8..568

特徴を表す記号：mutation

存在位置：2

特徴を表す記号：mutation

存在位置：5

特徴を表す記号：mutation

\* 存在位置：11

配列

```

GTCCCTCATG CTTCGACCAT TGAAGTGCAT CGTCGCCGTG TCCCAAAATA TGGGGATTGG    60
CAAGAACGGA GACCTACCCT GGCCTCCGCT CAGGAACGAG TTCAAGTACT TCCAAAGAAT    120
GACCACAACC TCTTCAGTGG AAGGTAAACA GAATCTGGTG ATTATGGGTA GGAAACCTG    180
GTTCTCCATT CCTGAGAAGA ATCGACCTTT AAAGGACAGA ATTAATATAG TTCTCAGTAG    240
AGAACTCAAA GAACCACCAC GAGGAGCTCA TTTTCTTGCC AAAAGTTTGG ATGATGCCTT    300
AAGACTTATT GAACAACCGG AATTGTCAAG TAAAGTAGAC ATGGTTTGA TAGTCGGAGG    360
CAGTTCTGTT TACCAGGAAG CCATGAATCA ACCAGGCCAC CTCAGACTCT TTGTGACAAG    420
GATCATGCAG GAATTTGAAA GTGACACGTT TTTCCAGAA ATTGATTGG GGAAATATAA    480
ACTTCTCCCA GAATACCCAG GCGTCCTCTC TGAGGTCCAG GAGGAAAAAG GCATCAAGTA    540
TAAGTTTGAA GTCTACGAGA AGAAAGACTA ACAGGAAGAT GCTTTCAAGT TCTCTGCTCC    600
CCTCCTAAAG CTATGCATTT TTATAAGACC ATGGGACTTT TGCTGGCTTT A          651

```

【0133】配列番号：26

※ 存在位置：0`1

配列の長さ：1321

特徴を表す記号：Cleavage-site

配列の型：核酸

存在位置：1321`1322

鎖の数：二本鎖

特徴を表す記号：transposon

トポロジー：直鎖状

存在位置：1..354

配列の種類：cDNA

特徴を表す記号：CDS

アンチセンス：NO

存在位置：355..1146

配列の特徴

特徴を表す記号：mutation

特徴を表す記号：Cleavage-site

※ 存在位置：358

配列

```

GCTTCACGCT GCCGCAAGCA CTCAGGGCGC AAGGGCTGCT AAAGGAAGCG GAACACGTAG    60
AAAGCCAGTC CGCAGAAACG GTGCTGACCC CGGATGAATG TCAGCTACTG GGCTATCTGG    120
ACAAGGGAAG ACGCAAGCGC AAAGAGAAAG CAGGTAGCTT GCAGTGGGCT TACATGGCGA    180
TAGCTAGACT GGGCGGTTTT ATGGACAGCA AGCGAACCGG AATTGCCAGC TGGGGCGCCC    240
TCTGGTAAGG TTGGGAAGCC CTGCAAAGTA AACTGGATGG CTTTCTTGCC GCCAAGGATC    300
TGATGGCGCA GGGGATCAAG ATCTGATCAA GAGACAGGAT GAGGATCGTT TCGCATGCTT    360
GAACAAGATG GATTGCACGC AGGTTCCTCG GCCGCTTGGG TGGAGAGGCT ATTCGGCTAT    420
GACTGGGCAC AACAGACAAT CGGTGCTCTT GATGCCGCCG TGTTCGGCT GTCAGCGCAG    480
GGGCGCCCGG TTCTTTTTGT CAAGACCGAC CTGTCCGGTG CCCTGAATGA ACTGCAGGAC    540
GAGGCAGCGC GGCTATCGTG GCTGGCCACG ACGGGCGTTC CTTGCGCAGC TGTGCTCGAC    600
GTTGTCACTG AAGCGGAAG GGAAGGCTG CTATTGGGCG AAGTGCCGGG GCAGGATCTC    660
CTGTCACTC ACCTTGCTCC TGCCGAGAAA GTATCCATCA TGGCTGATGC AATGCCGCGG    720
CTGCATACGC TTGATCCGGC TACCTGCCCA TTCGACCACC AAGCGAAACA TCGATCGAG    780
CGAGCACGTA CTCGGATGGA AGCCGGTCTT GTCGATCAGG ATGATCTGGA CGAAGAGCAT    840
CAGGGGCTCG CGCCAGCCGA ACTGTTCCGC AGGCTCAAGG CGCGCATGCC CGACGCGAG    900
GATCTCGTCG TGACCCATGG CGATGCCTGC TTGCCGAATA TCATGGTGA AAATGGCCGC    960
TTTTCTGGAT TCATCGACTG TGGCCGGCTG GGTGTGGCGG ACCGCTATCA GGACATAGCG    1020
TTGGCTACCC GTGATATTGC TGAAGAGCTT GCGCGCGAAT GGGCTGACCG CTTCTCTGTG    1080
CTTTACGGTA TCGCCGCTCC CGATTGCGAG CGCATCGCCT TCTATCGCCT TCTTGACGAG    1140
TTCTTCTGAG CGGGACTCTG GGGTTGAAA TGACCGACCA AGCGACGCC AACCTGCCAT    1200
CAGGAGATTT CGATTCCACC GCCGCCTTCT AAGAAAGGTT GGGCTTCGGA ATCGTTTTCC    1260

```

47

48

GGGACGCCGG CTGGATGATC CTCAGCGCG GGATCACATG CTGGATTCTT CGCCACCCC 1320  
G 1321

【0134】配列番号：27

配列の長さ：470

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

アンチセンス：NO

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：0~1

特徴を表す記号：Cleavage-site

\* 存在位置：470~471

特徴を表す記号：bGH polyA signal(1)

存在位置：6..234

特徴を表す記号：terminator

存在位置：20..25

特徴を表す記号：terminator

存在位置：96..101

10 特徴を表す記号：bGH polyA signal(2)

存在位置：241..469

特徴を表す記号：terminator

\* 存在位置：331..336

配列

CTAGACTGTG CCTTCTAGTT GCCAGCCATC TGTGTGTTGC CCCTCCCCCG TGCTTCCTT 60  
GACCCGGAA GGTGCCACTC CCATCTGCCT TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA 120  
TTGTCTGAGT AGGTGTCATT CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA 180  
GGATTGGGAA GACAATAGCA GGCATGCTGG GGATGCGGTG GGCTCTATGG GTACAGATCC 240  
CTGTGCCCTT TAGTTGCCAG CCATCTGTTG TTTGCCCTC CCCCCTGCCT TCCTTGACCC 300  
TGGAAGGTGC CACTCCCACT GTCCTTTCCT AATAAAATGA GGAAATTGCA TCGCATTGTC 360  
TGAGTAGGTG TCATTCTATT CTGGGGGGTG GGGTGGGGCA GGACAGCAAG GGGGAGGATT 420  
GGGAAGACAA TAGCAGGCAT GCTGGGGATG CGGTGGGCTC TATGGGTACC 470

【0135】配列番号：28

配列の長さ：1392

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

アンチセンス：NO

※ 配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：0~1

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：1392~1393

特徴を表す記号：CDS

※ 存在位置：106..1263

配列

GGCCGCTCAC AACTTGCTTT CCTGTGTCCA ATAGCACTGC AGACTCCAGT ACTAGCCTGT 60  
CCAGAGCAGC AAGTGAGAGG AAACAAGCCA GCATTGTAAG AGGACATGCT TCTCTCCCT 120  
CTCTCCGTGC TGCTCCTGCT CACACAGCCC TGGAGATCCC TGGGAGCAGA AATGACAACC 180  
TTTTCTCAGA AAATACTGGC CAATGCCTGT ACCCTGGTTA TGTGTAGCCC CCTGGAGAGT 240  
GGCTTGCCCTG GTCATGATGG ACAAGATGGG AGAGAATGTC CCCATGGAGA GAAGGGGGAT 300  
CCAGGTTCAC CAGGACCTGC AGGACGAGCA GGAAGGCTG GATGGGTTGG CCCTATTGGG 360  
CCGAAAGGAG ACAATGGCTT TGTGGAGAA CCTGGACCAA AGGAGACAC TGGGCCACGT 420  
GGGCTCCAG GTATGCCTGG ACCAGCTGGA AGAGAAGGCC CCTCAGGGAA GCAGGGGAGC 480  
ATGGGACCTC CAGGCACACC AGGCCCCAAA GGAGAGACTG GGCCCAAAGG AGGAGTGGGT 540  
GCCCCAGGCA TACAGGCTT CCCAGGCCCC TCGGTCTCA AAGGAGAGAA AGGTGCCCCC 600  
GGGAGACTG GAGCCCTGG ACGTGCTGGG GTGACAGGGC CTCTGGAGC AATAGGTCCA 660  
CAGGGCCCTT CAGGTGCCAG GGGCCCCCA GACTGAAGG GGGACAGAGG TGATCCTGGA 720  
GAAACAGGAG CAAAGGGGGA GAGTGGCTT GCAGAGGTCA ATGCTCTCAA GCAGCGGTA 780  
ACCATCTTAG ATGGACATCT ACGCCGGTTC CAAAATGCCT TCAGTCAGTA TAAGAAGGCG 840  
GTGCTCTTCC CTGATGGCCA GGCTGTGGG GAGAAGATCT TCAAGACAGC AGGTGCTGTA 900  
AAGTCATATT CAGATGCAGA GCAGCTCTGC AGAGAGGCTA AGGACAGCT GGCCTCCCCA 960  
CGCTCTTCC CCGAGAACGA GGCGTGACA CAGATGGTCA GAGCCAGGA AAAGAATGCT 1020  
TACCTGAGCA TGAATGACAT CTCCACGGAG GGGAGGTTCA CTTACCCAC TGGGGAAATA 1080  
CTGGTCTATT CCAACTGGGC CGATGGGGAG CCCAACAACA GTGATGAGGG ACAACCAGAG 1140  
AACTGTGTGG AAATCTTTCC TGATGGCAAG TGGGAATGAC TACCCTGCAG TAAGCAACTC 1200

49

50

CTTGTGATCT GCGAGTTTGT AGCTCTCCCA CCCACCCAG GGAAGGGGCA GTGCCAGAG 1260  
 CTGTGAGCTG CCAACATCCC AATAAAAAGG TGACCCTCTG CTGCTCAGGG CTTCGCCACT 1320  
 GAGCCACGGG ATGAGGCCAC CAGGCAGGCC TCCTATGGAA CTCCTCCCTC AGAATAAAGT 1380  
 TTGAAACTGG CT 1392

## 【0136】配列番号：29

配列の長さ：94

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

## \* 配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：0<sup>1</sup>

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：91<sup>92</sup>

\* 10

配列

GATGAATGTA TGTCAGCTAC TGGGCTATCA GGGAAAACGA AATACCAAGC GCAATGTTGA 60  
 ATGGGGGATG TGA TAGTAG TTAAGTTAGA TATC 94

## 【0137】配列番号：30

配列の長さ：50

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：NO

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

※ 存在位置：1<sup>2</sup>

配列

GATGAATGTA TGTCAGCTAC TGGGCTATCA GGGAAAACGA AATACCAAGC 50

## 【0138】配列番号：31

配列の長さ：48

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

★ トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

★

配列

TATTCGTTT TCCCTGATAG CCCAGTAGCT GACATACATT CATCTGCA 48

## 【0139】配列番号：32

配列の長さ：44

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

☆ トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：NO

☆ 30

配列

GCAATGTTGA ATGGGGGATG TGA TAGTAG TTAAGTTAGA TATC 44

## 【0140】配列番号：33

配列の長さ：50

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

◆ 存在位置：3<sup>4</sup>

配列

GATATCTAAC TTA ACTACTA GTCACATCCC CCATTCAACA TTGCGCTTGG 50

## 【0141】配列番号：34

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：NO

配列の特徴

特徴を表す記号：Cleavage-site

存在位置：3<sup>4</sup>

配列

GATATCGTTT CGCATGCTTG AAC 23

## 【0142】配列番号：35

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

50 配列の特徴

特徴を表す記号: Cleavage-site

配列

GGATCCTCAG AAGAACTGGT CAA

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、バックボーンベクターpBBVリンカー作製のフローチャートを示す。

【図2】図2は、pCV3(SV40関連遺伝子クローニング用)作製のフローチャートを示す。

【図3】図3は、pCV4(MCS関連遺伝子クローニング用)作製のフローチャートを示す。

【図4】図4は、DHFRカセット構築用プラスミドpSVP(D)S-1作製のフローチャートを示す。

【図5】図5は、NEOカセット構築用プラスミドpSVP(D)S-2作製のフローチャートを示す。

【図6】図6は、DHFRカセットベクターpSVP(D)S/DHFR作製のフローチャートを示す。

\* \* 存在位置: 1'2

23

※【図7】図7は、NEOカセットベクターpSVP(D)S/NEO作製のフローチャートを示す。

【図8】図8は、MCSカセットベクターpEXP-BL2作製のフローチャートを示す。

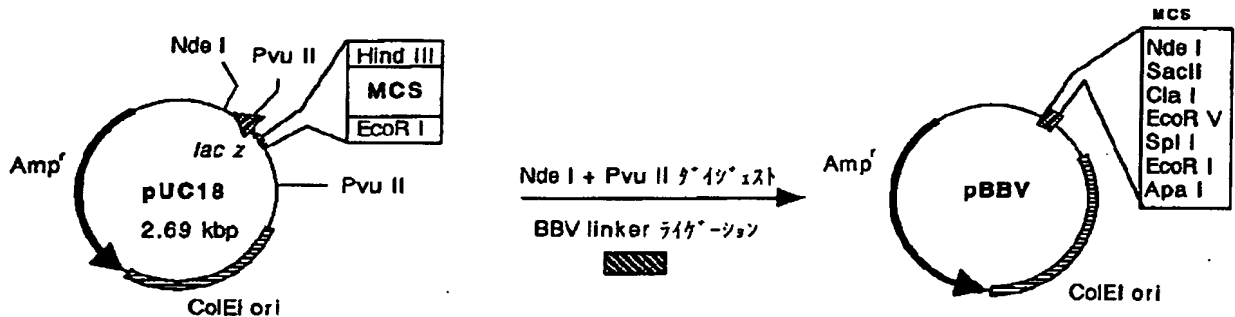
【図9】図9は、本発明の発現ベクターpNOW/CMV-A構築のフローチャートを示す。

10 【図10】図10は、本発明の発現ベクターpNOW/CMV-Aのマップを示す。

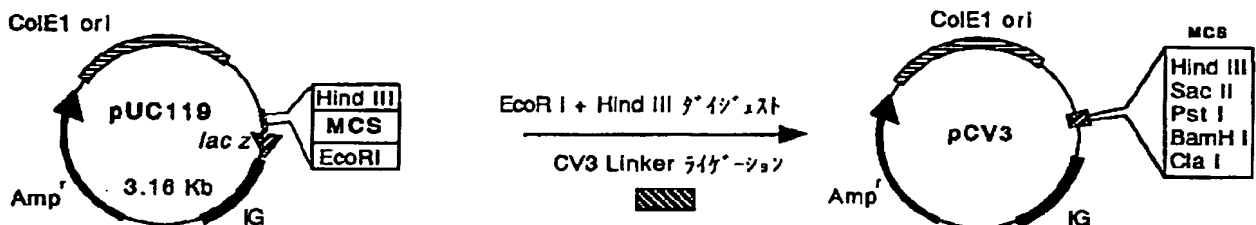
【図11】図11は、本発明の発現ベクターpNOW/CMV-A構築のためのpSVP(D)S/NEO-A構築のフローチャートを示す。

※ 【図12】図12は、本発明の発現ベクターpNOW/CMV-Aのマップを示す。

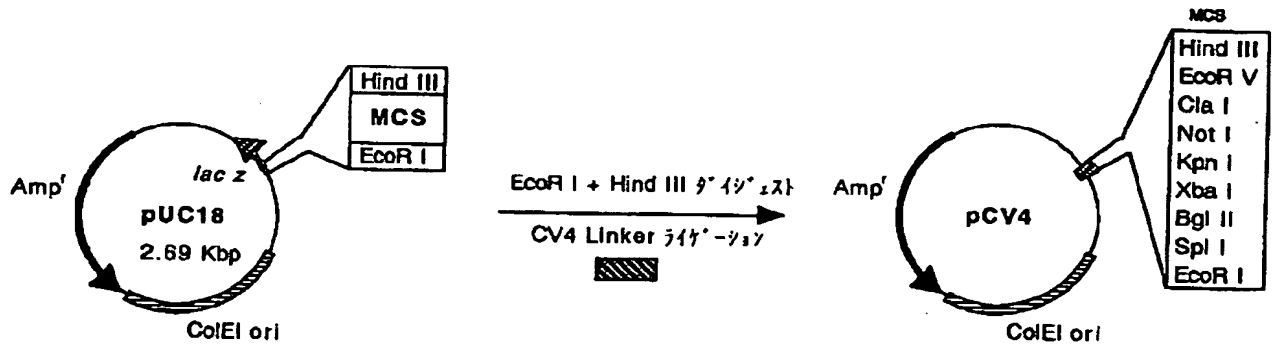
【図1】



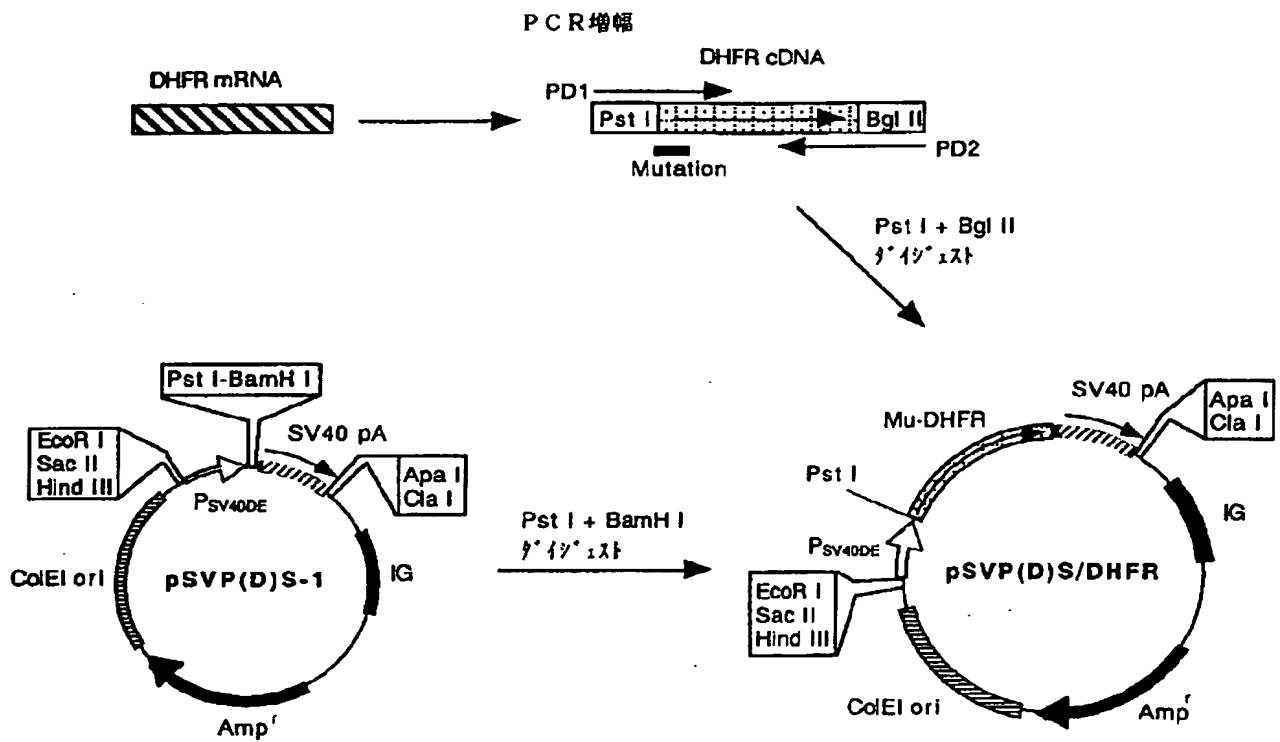
【図2】



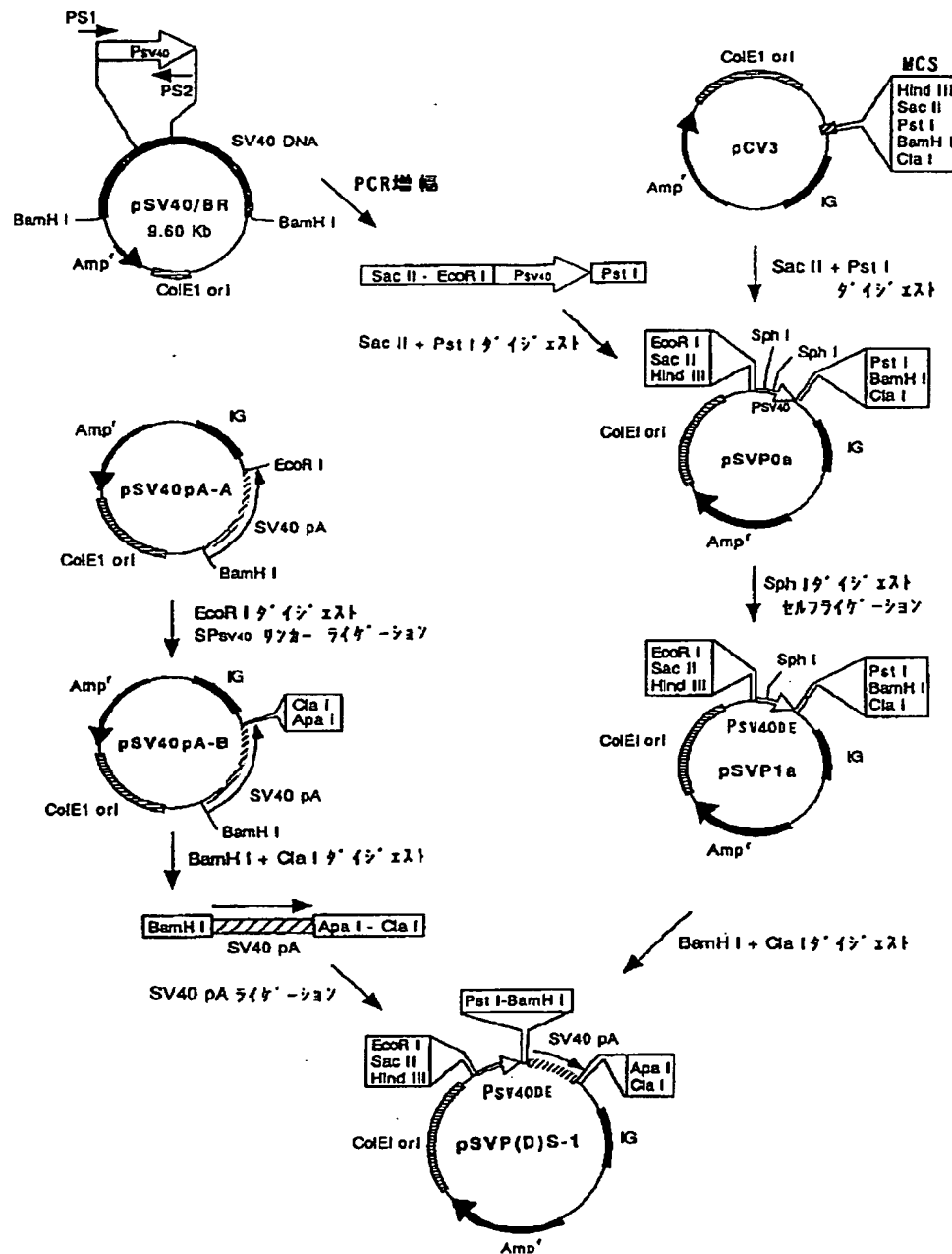
【図3】



【図6】



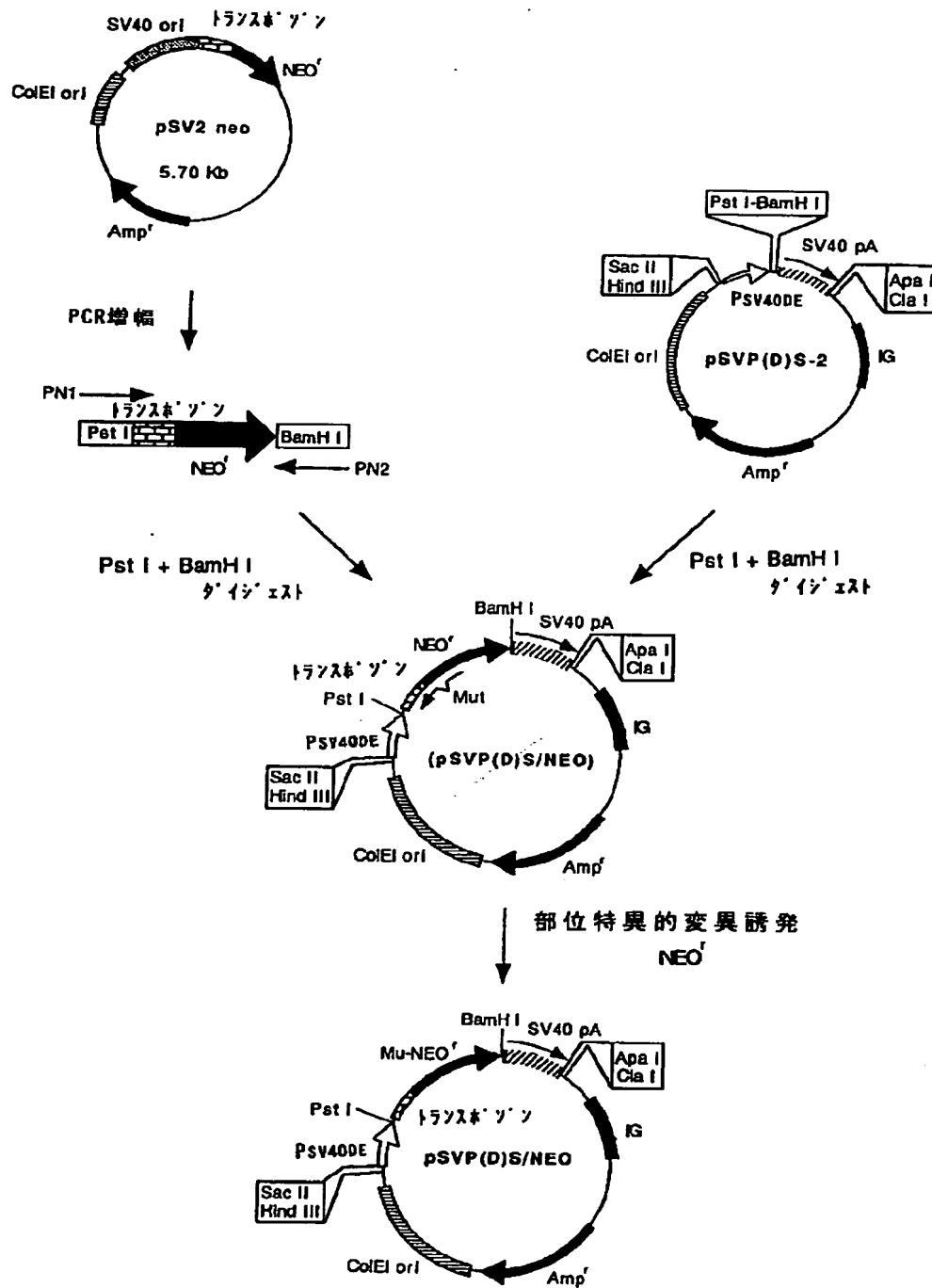
【図4】



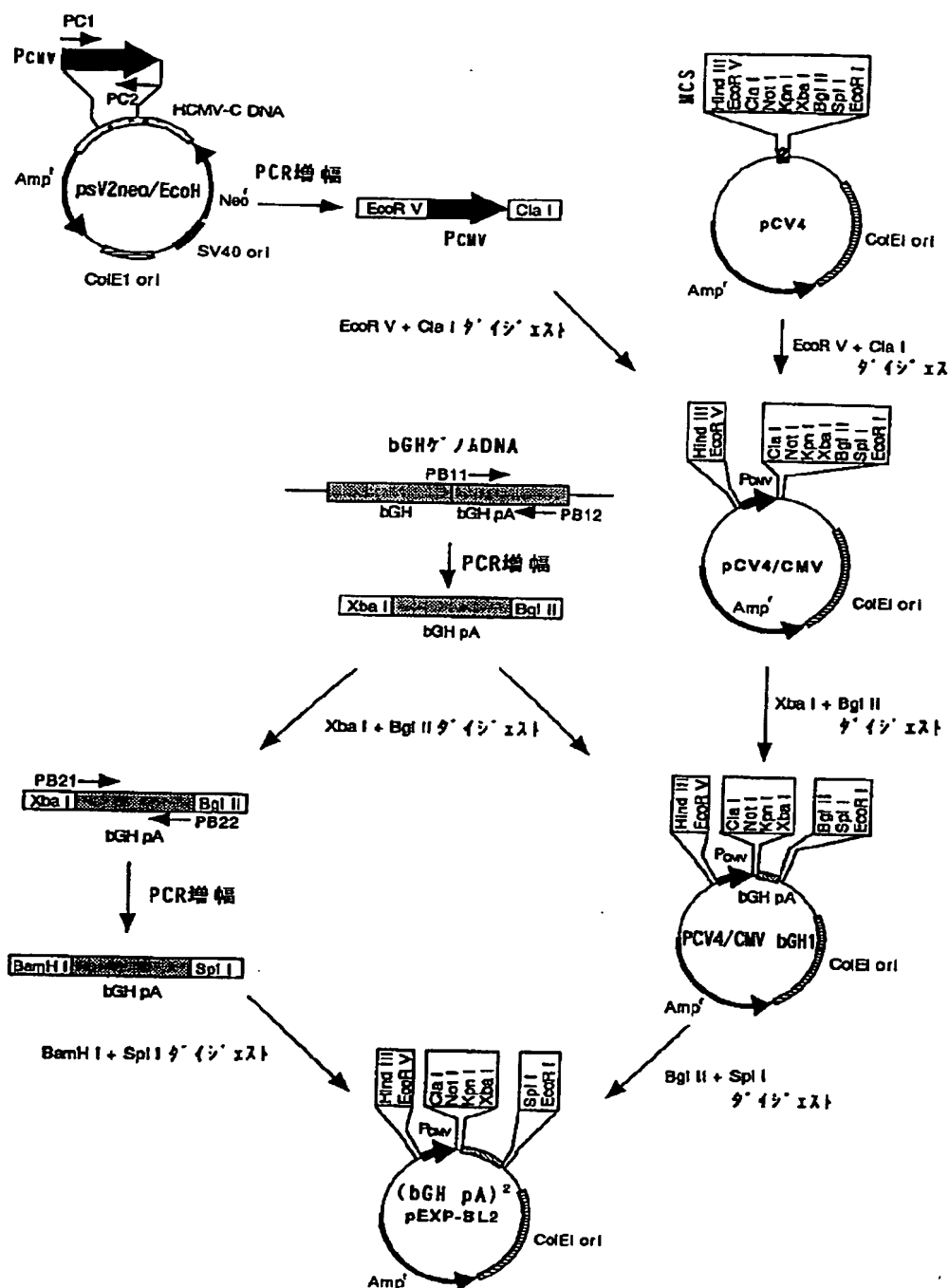
The diagram illustrates the construction of the pSVP(D)S-2 vector through a series of cloning steps:

- Starting Material:** pSV40/BR (9.60 Kb) vector, which includes a PS3 promoter, Psv40 promoter, PS2 promoter, SV40 DNA, BamH I sites, Amp<sup>r</sup>, and ColE1 ori.
- PCR Amplification:** The pSV40/BR vector is amplified using PCR to create a fragment containing the Sac II, Psv40, and Pst I sites.
- Cloning into pCV3:** The PCR product is inserted into the pCV3 vector (ColE1 ori, Amp<sup>r</sup>, IG, MCS) via Sac II + Pst I digestion to form pSVP0b.
- Cloning into pSV40DE:** pSVP0b is digested with Sph I to perform a tail-flip reaction, resulting in pSV40DE (Pst I-BamH I) and pSVP1b (Sph I).
- Cloning into pSVP(D)S-2:** pSVP1b is digested with BamH I + Cla I to perform a tail-flip reaction, resulting in pSV40DE (Pst I-BamH I) and pSVP(D)S-2.
- Final Vector:** pSVP(D)S-2 contains the SV40 pA, Pst I-BamH I, SV40 pA, and Amp<sup>r</sup> sites.

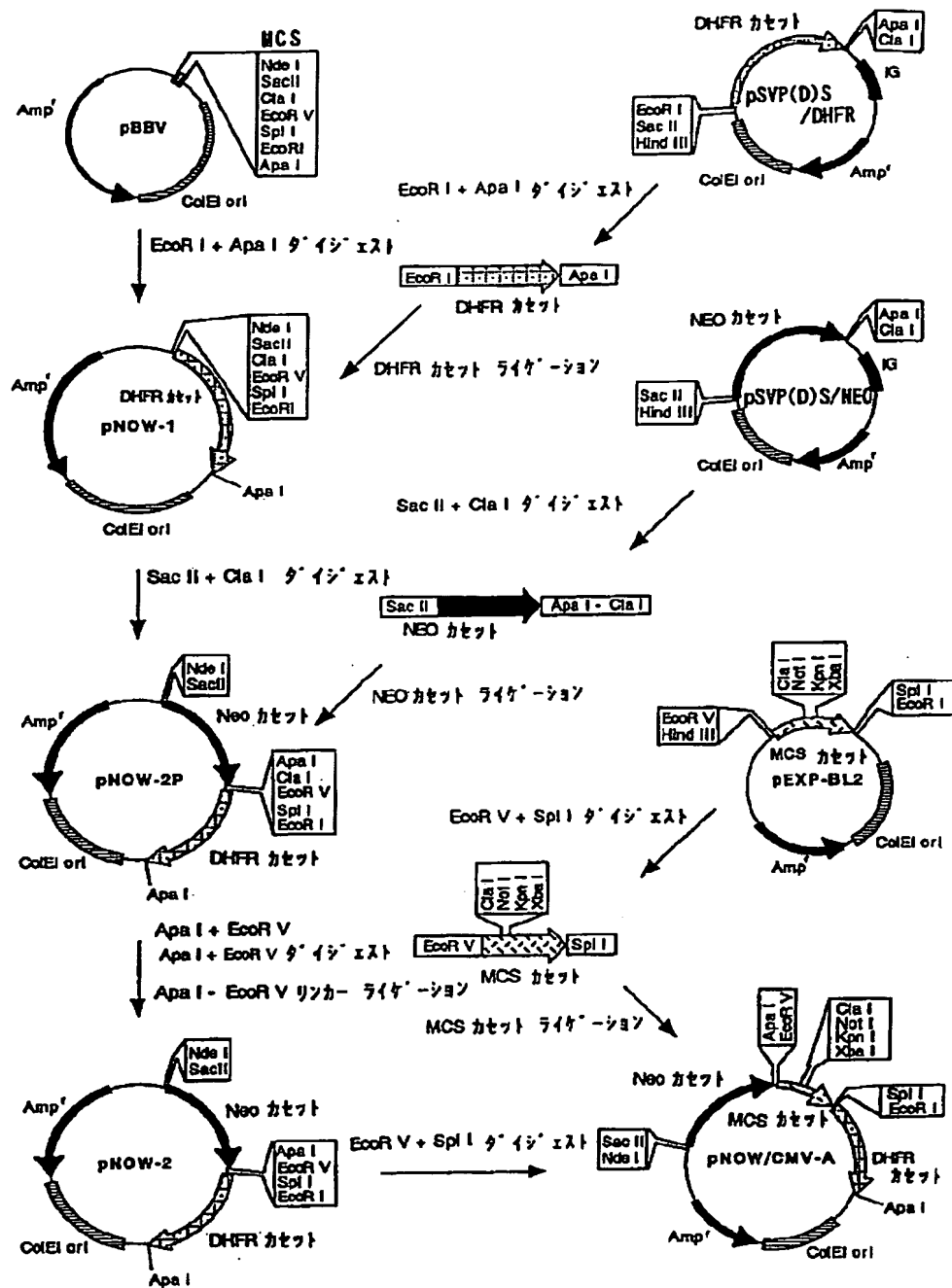
【図7】



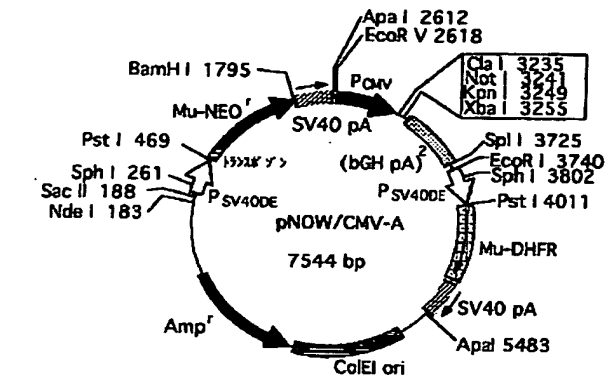
【図8】



【図9】

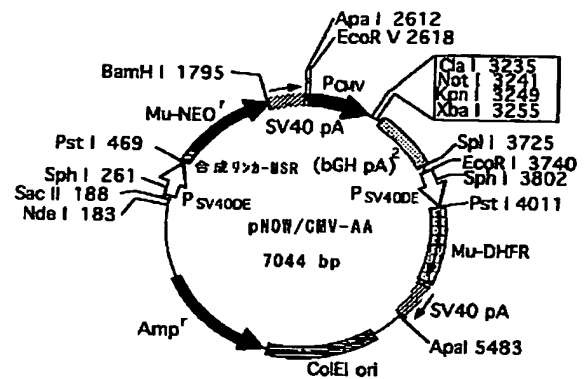


【図10】



Amp<sup>r</sup> アンピシリン耐性遺伝子  
 (bGH pA)<sup>2</sup> ウシ成長ホルモンポリアダニレーションシグナル  
 ColEI ori 大腸菌複製オリジン  
 Mu-DHFR 疫菌導入されたDHFR遺伝子  
 Mu-NEO<sup>r</sup> 疫菌導入されたネオマイシン耐性遺伝子  
 PCMV ヒトサイトメガロウイルス、Major Immediate-Early 抗原プロモーター  
 P SV40DE 酸化SV40プロモーター (SV40複製オリジンを含む)  
 SV40 pA SV40ポリアダニレーションシグナル  
 19728'7'7' トランスボゾン配列

【図12】



Amp<sup>r</sup> アンピシリン耐性遺伝子  
 (bGH pA)<sup>2</sup> ウシ成長ホルモンポリアダニレーションシグナル  
 ColEI ori 大腸菌複製オリジン  
 Mu-DHFR 疫菌導入されたDHFR遺伝子  
 Mu-NEO<sup>r</sup> 疫菌導入されたネオマイシン耐性遺伝子  
 PCMV ヒトサイトメガロウイルス、Major Immediate-Early 抗原プロモーター  
 P SV40DE 酸化SV40プロモーター (SV40複製オリジンを含む)  
 SV40 pA SV40ポリアダニレーションシグナル  
 合成9728-MSR 合成リンカー配列

(第1配列) 5' 3' (第2配列) 5'

MSR-linker 1(+) MSR-linker 2(+)

PstI (CCAAGC) EcoRV (GCTTGG)

MSR-linker 1(-) MSR-linker 2(-)

PCR接続  
アニーリング

PCR増幅

PCR接続

Nu-NEOカセットライゲーション

PstI + BamHI  
ハーフシタリング・テスト